

*La quitridiomicosi a la comunitat
d'amfibis del massís de les Gavarres*



Iago Pérez Novo

Biblioteca *Lluís Esteva* - 16

***La quitridiomicosi a la comunitat
d'amfibis del massís de les Gavarres***

Iago Pérez Novo

La **Biblioteca Lluís Esteva** neix de la voluntat de publicar els treballs guanyadors del Premi Joan Xirgo, organitzat pel Consorci de les Gavarres des de l'any 2001. La col·lecció pren el nom de Lluís Esteva i Cruañas (Sant Feliu de Guíxols, 1906-1994), que va dedicar una gran part de la seva vida a la descoberta, l'estudi i la divulgació del patrimoni històric.

Edita:



**Consorci
Gavarres**



Diputació de Girona

Col·laboren:



Generalitat de Catalunya
**Departament d'Acció Climàtica,
Alimentació i Agenda Rural**



Generalitat de Catalunya
**Delegació Territorial del Govern
a Girona**



Consell
Comarcal
del Gironès

© Consorci de les Gavarres
Finca Camps i Armet, s/núm.
17121 Monells
e-mail: consorci@gavarres.cat
www.gavarres.cat
Fotografia de portada: Iago Pérez Novo
Disseny gràfic i maquetació: 3 de Nou Publicitat

1. RESUM	11
2. INTRODUCCIÓ	13
2.1. ANTECEDENTS	13
2.2. OBJECTIUS.	17
3. METODOLOGIA	19
4. ÀREA D'ESTUDI	27
5. EL POBLAMENT D'AMFIBIS AL MASSÍS	29
6. RESULTATS	33
6.1. RIQUESA D'AMFIBIS	33
6.2. CAPTURES	34
6.3. MOSTRES ANALITZADES	35
6.4. PRESENÇA DE PATÒGENS EN AMFIBIS	44
6.4.1. Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)	46
6.4.2. Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal)	47
6.4.3. Ranavirus	47
6.4.4. Altres patògens: dermocistidis	47
6.5. PRESENÇA DE PATÒGENS A LES DIFERENTS LOCALITATS	49
6.5.1. Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)	49
6.5.2. Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal)	52
6.5.3. Ranavirus	52
6.5.4. Altres patògens: dermocistidis	53
6.6. PRESENÇA DE PATÒGENS EN POSSIBLES RESERVORIS	53
6.7. PREVALENÇA DE Bd	54
6.7.1. Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)	54
6.7.2. Batrachochytrium salamandrivorans (Bsal).	55
6.7.3. Ranavirus	55
6.7.4. Altres patògens: dermocistidis	55
6.8. HÀBITATS ON S'HAN DETECTAT PATOGENS	56
6.9. INCIDÈNCIA	57
6.10. MAPES DE DISTRIBUCIÓ DELS PATÒGENS	59

7. MESURES DE PREVENCIÓ	65
8. CONCLUSIONS	67
9. AGRAÏMENTS	73
10. BIBLIOGRAFIA	75
ANNEXOS	81
RELACIÓ DE FIGURES I TAULES	91

Aquest estudi ha permès disposar d'un major coneixement sobre les malalties emergents a la comunitat d'amfibis del Massís de les Gavarres. S'ha conegut a quines espècies d'amfibis està present Bd, la seva prevalença en el tòtil (*Alytes obstetricans*) en diferents estacions de l'any i la incidència de la quitridiomicosi al Massís.

S'ha comprovat mitjançant tècniques moleculars de detecció de DNA (PCR qualitativa o nested PCR) la presència de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) a la comunitat d'amfibis del Massís de les Gavarres, concretament a 4 de les 8 localitats que s'han estudiat, i a 5 de les 11 espècies d'amfibis analitzades: El tòtil (*Alytes obstetricans*), el tritó verd (*Triturus marmoratus*), la reineta (*Hyla meridionalis*), la granota pintada (*Discoglossus pictus*) i el gripau corredor (*Epidalea calamita*).

També s'ha comprovat l'absència de *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) i Ranavirus a les 41 i 98 mostres analitzades respectivament per a cada patògen. A més, també s'ha detectat la presència d'unes vesícules sospitoses en tritó palmat (*Lissotriton helveticus*) i tritó verd (*Triturus marmoratus*) a 2 localitats. Aquests símptomes han estat provocats presumptament per un microorganisme del regne dels protists, un dermocistidi paràsit d'amfibis.

S'ha detectat Bd en individus que estaven en medi aquàtic i d'altres que estaven en medi terrestre. Han sortit resultats positius a Bd tant a ambients lenítics com lòtics. El dermocistidi només s'ha detectat en ambients lenítics i només en urodels.

S'han detectat amfibis infectats per Bd a les 3 estacions de l'any (hivern primavera i estiu) en què s'han agafat mostres.

Gairebé tots els animals infectats amb Bd que s'han detectat són portadors asimptomàtics.

La prevalença de Bd calculada en tòtil a la localitat "Celrà" ha estat més alta a l'hivern que a l'estiu.

La quitridiomicosi causada per Bd té una incidència molt baixa al Massís de les Gavarres, ja que no s'han trobat mortalitats massives d'amfibis. Només s'ha detectat, fins el moment, un cas de mortalitat associada a Bd al Massís de les Gavarres: una granota pintada trobada morta a la localitat "Madremanya". Aquest és el primer cas descrit de mortalitat associada a Bd en granota pintada (*Discoglossus pictus*) a Catalunya i al món, recolzada per anàlisis moleculars en dos laboratoris diferents (LABOKLIN i MNCN-CSIC) i anàlisis histològics a dos centres especialitzats (C.R.A.R.C. i servei d'histopatologia de la U.A.B.) que corroboren les altes càrregues de zoòspores a la pell d'aquest individu.

Pel que fa a les malalties generades pels altres 3 patògens estudiats (Bsal, Ranavirus i dermocistidi), la incidència és nul·la fins el moment al Massís de les Gavarres, ja que no s'han detectat casos nous de mortalitat associada per aquests microorganismes.

No s'ha pogut corroborar la presència de Bd ni Ranavirus a les 17 mostres de cranc vermell americà (*Procambarus clarkii*) analitzades en mostra agrupada.

El treball en xarxa ha estat imprescindible per a la detecció d'amfibis morts en aquest estudi.

Sense la col·laboració del Cos d'Agents Rurals i el suport del Consorci de les Gavarres aquest estudi no s'hauria pogut portar a terme.

S'ha confeccionat un mapa editable de distribució dels 4 patògens estudiats, que permetrà tenir constància dels casos d'infecció detectats fins ara i pot esdevenir una eina de bolcat de dades i de consulta per a futures investigacions d'aquests patògens al Massís de les Gavarres.

2.1. ANTECEDENTS

Els amfibis són un grup de vertebrats amenaçat a escala global (Stuart *et al.*, 2004), fet que provoca un interès creixent en la seva conservació. Una de les amenaces més greus que pateixen actualment, a banda de la pèrdua d'hàbitat, és l'afectació de les malalties emergents com la quitridiomicosi, la ranavirosi i altres malalties emergents poc estudiades com les causades per protists anomenats dermocistidis.

La detecció al 1997 d'una mortalitat massiva d'amfibis al Parc Natural de Peñalara (Sierra de Guadarrama, Madrid) va obrir una línia d'investigació per a descobrir quin era l'agent causant de la mort de milers d'amfibis en aquest indret. Les mostres extretes als animals morts i moribunds van ajudar a determinar que es tractava d'un fong quítrid al 1998. Finalment, Longcore *et al.*, 1999, van poder descriure una nova espècie per a la ciència, el quitridiomicet *Batrachochytrium dendrobatidis* (d'ara endavant anomenat Bd).

Aquest fong és paràsit d'amfibis, i es tracta del primer fong quítrid descobert que parasita vertebrats, ja que fins llavors només es tenia constància que algunes espècies de fongs quítrids parasitaven plantes i invertebrats. L'espora del quitridi s'instal·la a la queratina, present a la pell dels amfibis metamòrfics i adults (figura 1).

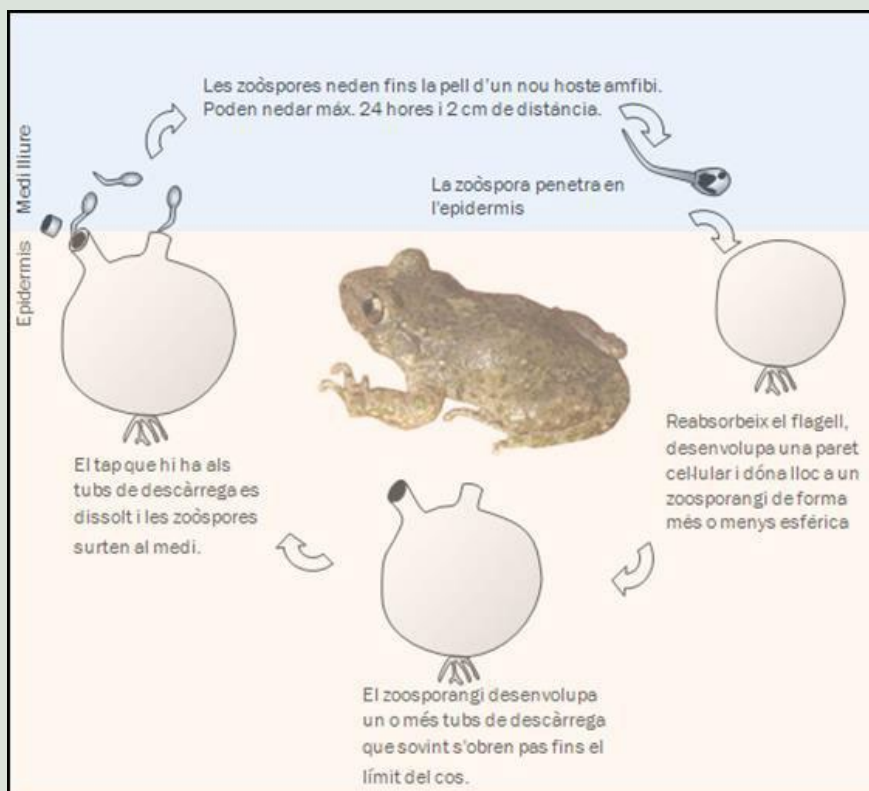


Figura 1: Cicle biològic del fong *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd). Font: J.A. Melero, Herpetofull nº 11 de la Societat Catalana d'Herpetologia.

Les larves només tenen aquesta proteïna al disc oral. És per això que les infeccions a les larves no acostumen a ser letals amb aquest patògen. Quan fan la metamorfosi la queratina s'expandeix pel cos i el fong guanya terreny (Mc Mahon T.A., & Rohr J.R. 2014). És llavors quan el paràsit pot arribar a matar a l'hoste en pocs dies. Per tant, els metamòrfics són els més afectats per la malaltia (figura 2).



Figura 2: Exemplar recent metamorfozat de tòtil (*Alytes obstetricans*) trobat mort a Canillas de Aceituno, Málaga. Font: Bosch, J. Susceptibilidad a la quitridiomycosis. 2012.

La malaltia causada per Bd s'anomena quitridiomycosi. Ha estat catalogada com la més perillosa pels vertebrats en relació al nombre d'espècies afectades i al seu potencial de provocar extincions (Gascon *et al.*, 2007). Recentment ha estat inclosa dins la llista de les 100 espècies exòtiques invasores més perjudicials del món, elaborada per l'organisme internacional d'experts sobre invasions biològiques de la UICN (Lowe S. *et al.*, 2004).

Segons estudis recents, sembla ser que Bd es va originar a principis del s. XX a l'Àsia oriental, concretament a la península de Corea, coincidint amb l'expansió global del comerç d'amfibis (O'Hanlon S.J. *et al.*, 2018). Actualment està ben distribuït per tota Europa i afecta a un ampli rang d'espècies (Garner *et al.*, 2005).

Aquest patògen emergent és un problema a nivell global ja que s'ha detectat a tots els continents on hi ha amfibis (Fisher *et al.*, 2009), i la malaltia que provoca està reconeguda com una de les principals causes del declivi generalitzat dels amfibis a tot el planeta (Löfller *et al.*, 2010). Tot i que la quitridiomycosi va ser associada inicialment a zones tropicals (Berger *et al.*, 1998), estudis posteriors han corroborat que Europa, i especialment la península ibèrica, és una zona altament susceptible per la presència del patògen i desenvolupament de la malaltia (Rödder *et al.*, 2009).

Existeix una variació en quan a la susceptibilitat entre les diferents espècies (Blaustein *et al.*, 2005). Segons estudis realitzats al Parc Natural de Peñalara, l'espècie més afectada inicialment va ser

el tòtil (*Alytes obstetricans*) (Bosch *et al.*, 2001), tot i que estudis posterior van detectar declivis poblacionals i mortalitats massives de salamandra (*Salamandra salamandra*) i gripau comú (*Bufo spinosus*) (Bosch & Martínez-Solano, 2006).

Els estudis sobre *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) realitzats a Europa (Garner *et al.*, 2005), (Bovero *et al.*, 2008), (Ohst *et al.*, 2013) i a la península ibèrica (Bosch *et al.*, 2001), (Bosch & Martínez-Solano, 2006), (Bosch & García-Alonso, 2012), (Hidalgo-Vila *et al.*, 2012), (Obón *et al.*, 2013) han aportat algunes dades sobre la presència, incidència i prevalença del fong en les poblacions d'amfibis. Tot i això encara hi ha força manca d'informació.

A Catalunya hi ha pocs casos publicats sobre amfibis que hagin resultat positius als anàlisis de Bd. Al 2015 es van detectar 6 exemplars afectats pel fong a 4 localitats diferents, a les comarques del Vallès Oriental, el Moianès, la Ribera d'Ebre i el Montsià (Bargalló *et al.*, 2016), (Fernández-Guiberteau *et al.*, 2016). Al 2016 també es van analitzar 25 mostres de diferents espècies d'amfibis al Parc Natural des Aiguamolls de l'Empordà (Saura-Mas *et al.*, 2016). De les 25 mostres, només una d'aquestes va resultar positiva en quitridi i l'espècie afectada va ser la granota pintada (*Discoglossus pictus*). Al 2015 es van detectar 2 casos positius a Bd en tritó verd (*Triturus marmoratus*), en el marc del Projecte de recuperació del tritó verd a la Serralada de Marina de la Societat Catalana d'Herpetologia (Maluquer-Margalef, J. *et al.*, 2017). Al 2016 van sortir 3 casos també positius a Bd en granotes verdes (*Pelophylax* complex): un a la comarca del Solsonès, un a Osona i un altre al Vallès Oriental. Tots tres casos van ser detectats en el marc del "projecte quitridi", de l'Escola de Natura de Parets del Vallès i la Societat Catalana d'Herpetologia (Miras *et al.*, 2017). Aquest últim projecte ha recollit les cites que hi havia publicades fins el moment a Catalunya sobre casos positius i negatius a Bd (figura 3).

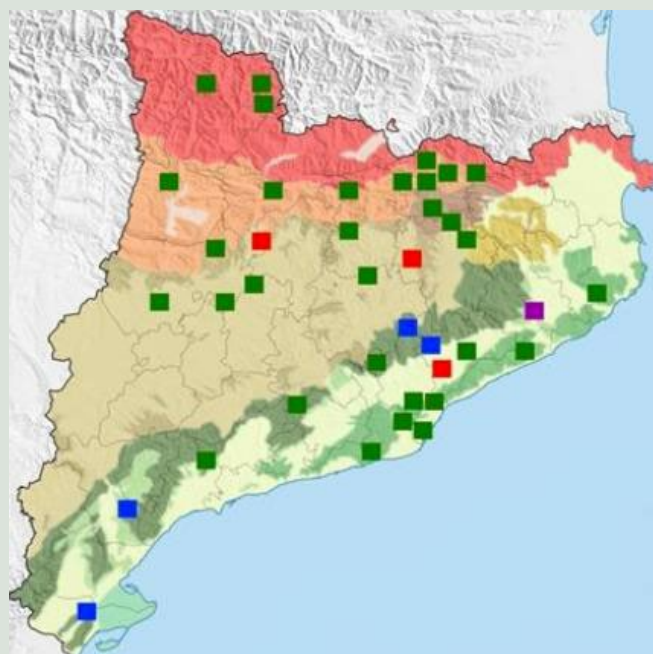


Figura 3: Mapa on es recullen els casos positius i negatius a Bd a Catalunya fins l'any 2017. Les quadrícules 10x10 Km. marcades en verd signifiquen resultats negatius de Bd. Les vermelles, blaves i violetes indiquen resultats positius a Bd en diferents estudis realitzats: Fernández-Guiberteau *et al.* 2016, Miras, M. *et al.*, 2017 i plataforma "Bd maps".

Per altra banda, a l'illa de Mallorca es va detectar quitridi al 2005 en 4 poblacions de ferreret (*Alytes muletensis*), espècie en perill d'extinció, i va causar mortalitats considerables (Oliver J.A. et al., 2006). Tot i això, 10 anys més tard es va aconseguir eradicar el patogen amb èxit d'un 80% de les tolles on hi havia el fong inicialment, perdurant aquesta situació durant almenys 2 anys. Es va fer una combinació de dos estratègies per a combatre malalties a la natura: es van tractar els capgrossos amb antifúngic i es va fer una desinfecció química ambiental (Bosch, J. et al., 2015). Aquesta situació d'eliminació d'un patogen del medi natural és del tot excepcional. Es va poder portar a terme gràcies a les condicions tant especials dels torrents mallorquins, sistemes força aïllats, però és de molt difícil reproduir aquesta estratègia a gran part dels altres hàbitats on el fong està establert.

En aquesta dècada també s'han detectat altres malalties emergents d'amfibis a part del Bd. Des de l'any 2008 es van detectar, a Holanda, exemplars de salamandra (*Salamandra salamandra*) morts en diverses ocasions. A partir del 2010 es va observar en aquest mateix país un ràpid declivi de les poblacions d'aquesta espècie, però no es va poder atribuir a cap causa coneguda com la degradació de l'hàbitat o altres malalties emergents conegudes fins el moment (Spitzen-van der Sluijs A, et al., 2013), com el Bd o el *Ranavirus*. Arrel d'aquest descobriment, Martel et al. (2013) van aïllar el patogen que estava matant les salamandres i van fer un altre descobriment per a la ciència, una espècie nova de fong quitrid, que anomenarien *Batrachochytrium salamandrivorans*, (Bsal a partir d'ara). Des del descobriment d'aquest nou patogen d'amfibis, s'ha detectat Bsal a altres països propers com Bèlgica (Martel et al., 2014), Alemanya (Spitzen-van der Sluijs et al., 2016) o Anglaterra (Cunningham et al., 2015). Afecta principalment a urodels, i ja ha causat l'extinció local de moltes poblacions, sobretot de salamandra, a Holanda (Spitzen-Van Der Sluijs et al., 2013).

També s'han detectat casos a la península ibèrica de parasitisme d'amfibis per organismes protists de l'ordre Dermocystida, classe Mesomycetozoea. Són generalment paràsits d'animals que formen endòspores esfèriques de diàmetre de 2-20 µm. De les endòspores s'alliberen zoòspores, cèl·lules dispersives generalment amb un únic flagel en posició posterior. Les zoòspores infecten nous hostes i es converteixen en vesícules, i després en quists ulcerosos (Gonzalez-Hernández et al., 2010), creixent en mida y donant lloc a noves endòspores. Aquests dermocistidis paràsits d'amfibis s'han localitzat recentment a poblacions de Galícia (Galán & Dopereiro, 2017), Catalunya (Martínez-Silvestre et al., 2017) i Cantàbria (Diego-Rasilla, 2017), concretament afectant a exemplars de tritó palmat (*Lissotriton helveticus*) a Galícia i Catalunya, i a exemplars de tritó alpí (*Ichthyosaura alpestris*) a Cantàbria.

Un altre agent infeccios que ha generat mortalitats massives d'amfibis arreu del planeta és un virus anomenat *Ranavirus*. És l'organisme causant de la ranaviosi, malaltia coneguda ja des de 1965 (Granoff, 1989), tot i que, tant el número d'esdeveniments de mortalitat d'amfibis associats a *Ranavirus* com la quantitat de *Ranavirus* aïllats han augmentat notablement des de la dècada de 1980 (Duffus & Cunningham, 2010). Per això, els ranavirus són considerats una malaltia emergent d'amfibis (Daszak et al., 1999).

2.2. OBJECTIUS

Principal: Comprovar la possible presència, prevalença i incidència de la quitridiomicosi en les comunitats d'amfibis del Massís de les Gavarres mitjançant un treball de camp intens, recollida de mostres i posteriors anàlisis de laboratori.

Específics:

- Prioritzar les mostres dels exemplars recent metamorfosejats o adults, trobats morts, per comprovar la possible incidència de la malaltia a l'àrea d'estudi.
- Crear una xarxa de treball amb el cos d'agents rurals per estar al cas de qualsevol episodi de mortalitat d'amfibis durant el projecte i en el futur.
- Recollir mostres d'un màxim de 50 individus a cadascun dels punts de mostreig proposats, per detectar presència/absència del fong.

En el cas que es trobés presència de quitridi:

- Escollir 2 dels punts de mostreig que hagin donat positiu per quitridi i estudiar la prevalença de la malaltia recollint 20 mostres de l'espècie més susceptible a la malaltia.
- Fer un mapa de distribució del fong a l'EIN "Massís de les Gavarres".

3- METODOLOGIA

Primer de tot s'ha tramitat i obtingut una autorització de captura científica d'amfibis especificant les característiques de l'estudi. Donada la crítica situació de les malalties emergents d'amfibis l'administració competent ha generat un protocol de bioseguretat oficial (figura 4), el qual adjunten amb l'autorització i es detalla a continuació:



Generalitat de Catalunya
Departament de Territori i Sostenibilitat
**Direcció General de Polítiques Ambientals
i Medi Natural**

Annex de les autoritzacions de captura científica o de gestió d'amfibis

- 1.- En el cas de detecció de mortalitats o disminucions poblacionals significatives cal avisar al Cos d'Agents Rurals (93 561 70 00) i informar al Servei de Fauna i Flora (93 567 42 00).
- 2.- Comunicar la detecció d'espècies exòtiques invasores al Servei de Fauna i Flora (93 567 42 00). En el cas de captura d'exemplars d'aquestes espècies, en cap cas es tornaran els animals a la natura. S'han de fer arribar als Centres de Fauna del DTES per posteriorment sacrificar-los.
- 3.- Si l'equip de seguiment realitza controls sanitaris, enviar al Servei de Fauna i Flora els resultats analítics -positius i negatius- de malalties de declaració obligatòria (*quiritridiomicosis i ranavirus*) -dates, localització i espècies involucrades.
- 4.- Tot el maneig d'amfibis en el medi natural ha de complir aquestes directrius:
 - Manipulació dels animals només si és necessari i el mínim possible.
 - Els animals es tornaran a alliberar en el mateix punt de captura.
 - Si calen ser moguts per causes justificades (més de 2 km de distància), caldrà autorització administrativa.
 - S'utilitzarà guants de nitril, sense pols, d'un sol us per cada lloc de mostreig.
 - Containers i equips utilitzats hauran de desinfectar-se.
 - Si s'entra a l'aigua, el calçat ha de rentar-se i desinfectar-se immediatament després de la visita.

5.- Protocol de desinfecció

Tot el material utilitzat en contacte amb els animals o aigua del punt de maneig s'haurà de netejar i desinfectar seguint el següent protocol, de forma recomanable just després de la visita al lloc de mostreig i sempre abans d'anar a un altre punt de mostreig situat a més de 2 kilòmetres de distància.

- 5.1.- Es recomana canviar-se els guants de nitril el màxim possible de vegades entre animals i, com a mínim, sempre que hi hagi un mostreig en diferents punts d'aigua, per propers que siguin.

- 5.2.- Netejar tot el material de matèria orgànica, fang, restes de plantes...
- 5.3.- Esbaldir el material amb aigua neta.
- 5.4.- Desinfectar **sempre** el material (amb un dels següents mètodes, tot seguint la fitxa de seguretat i recomanacions del fabricant, **lluny de masses d'aigua i en llocs sense vegetació**):
- Hipoclorit sòdic diluït amb aigua (10% de lleixiu) durant 15 minuts.
 - Formalina al 10% per més de 10 minuts.
 - Virkon (10 mgr/ml o segons instruccions proveïdor) durant un minut.
 - Ox-virin.
 - Roba: rentar a 40°C amb detergent.
- 5.5.- Tot el material utilitzat no desinfectat en el punt de mostreig haurà de transportar-se dins bosses de plàstic i desinfectar al arribar al punt de desinfecció. Es recomana deixar assecar al sol tot el material utilitzat **però cal sempre desinfectar-lo**.

Figura 4: Protocol de bioseguretat oficial de la Generalitat de Catalunya.

S'ha seguit fidelment aquest protocol de bioseguretat oficial:

- S'han manipulat els animals el mínim possible i s'han alliberat al mateix punt on s'han capturat, exceptuant un individu de tritó verd (*Triturus marmoratus*) en el qual s'ha detectat una vesícula sospitosa al dors (Figura 21). Per a la gestió d'aquest urodel s'ha trucat als Agents Rurals del Gironès, els quals han recollit l'animal i l'han dirigit fins al seu destí, el Centre de Recuperació d'Amfibis i Rèptils de Catalunya (C.R.A.R.C.).

Primer, els Agents Rurals han portat l'animal al Centre de Recuperació de Fauna de Torreferrussa (C.R.F.T.) on ha passat uns dies, per error, i posteriorment ha estat traslladat al C.R.A.R.C., on finalment s'ha analitzat la vesícula (veure apartat 6.4.4; RESULTATS_altres patògens: dermocistidis).

- S'han fet servir diferents guants de nitril a cada localitat, canviat de guants varies vegades durant el mateix mostreig.

- Després de totes les jornades de mostreig s'ha netejat la matèria orgànica del material emprat i a continuació s'ha desinfectat a consciència tot el material de camp amb una solució de Virkon a l'1%, deixant-lo assecar posteriorment al Sol. (figura 5).



Ruixant un salabre amb Virkon.



Ruixant les botes amb Virkon.



Ruixant l'altre salabre amb Virkon.



Material desinfectat assecant-se al Sol.

Figura 5: Fotografies de les diferents fases del protocol de desinfecció del material després d'un mostreig.

El material emprat a l'estudi ha estat el següent:

- Guants de nitril sense pols
- Salabres
- Ruixador
- Botes d'aigua altes
- Desinfectant Virkon
- Safates i caixes de plàstic
- Etanol 96°
- Nevera portàtil
- Blocs refrigeradors
- Hisops estèrils amb punta de cotó de dues mides diferents (més amples pels adults i més estrets per a les larves)
- Bosses hermètiques
- Càmera digital
- Pipetes
- Fitxes de camp
- Pinces
- Llapis
- Pots de plàstic
- Taula plegable
- Eppendorffs
- Cadira plegable

Els mostrejos han estat majoritàriament diürns, tot i que també s'han fet mostrejos nocturns per aconseguir mostres del màxim d'espècies.

En arribar al punt de mostreig s'han buscat acuradament individus metamòrfics i adults de qual-sevol espècie que estiguin morts per les vores de la massa d'aigua (figura 5), ja que tenen probabilitats d'estar afectats per algun patògen. S'ha buscat sota pedres i troncs propers a la bassa, entre la vegetació i dins l'aigua. Per aquesta operació s'ha dedicat una mitjana d'1 minut / 2 m². Quan s'han localitzat individus morts s'ha procedit a agafar una mostra d'escames dèrmiques de l'animal per aconseguir ADN dels patògens fregant un hisop estèril pels laterals del cos, pels dits i

membranes interdigitals de les 4 potes, per la part inferior de les potes posteriors i per l'abdomen, tot això fent servir uns guants de nitril per a cada individu mort, si fos el cas, tal i com indica el protocol descrit per Hyatt *et al.*, (2007). Un cop presa la mostra, aquests hisops s'han guardat a la seva càpsula, on prèviament s'hi han afegit 3-4 gotes d'etanol 96° amb una pipeta per a una millor conservació de la mostra. Mentre s'ha portat a terme el mostreig, aquests hisops s'han conservat a una nevera portàtil a baixes temperatures. Tot seguit s'ha introduït el cadàver en un pot amb etanol 96°, s'ha etiquetat el pot (data, punt de mostreig, espècie i estadi de desenvolupament) i s'ha guardat en una bossa hermètica dins d'una nevera portàtil per tal de fer posteriors anàlisis histològics al C.R.A.R.C. de Masquefa i realitzar la necròpsia per tal de determinar la causa de la mort de l'animal.

Per altra banda, abans de començar el projecte, s'ha mantingut una reunió amb els caps dels Cossos d'Agents Rurals del Gironès i el Baix Empordà per tal de que, si en qualsevol moment el cos detectava una mortalitat d'amfibis o animals moribunds al Massís de les Gavarres, emetessin un avís a l'autor del projecte. Quan s'ha rebut l'avís informant que s'ha detectat un amfibi mort s'ha anat a recollir immediatament i s'ha seguit el mateix procediment explicat anteriorment pels individus morts trobats per l'autor.

Seguint amb el protocol de mostreig, en cas de no trobar exemplars morts i, en canvi, trobar adults o metamòrfics vius en bona condició física, s'ha agafat una mostra *in situ* de cada individu seguint el protocol esmentat anteriorment (Hyatt *et al.*, 2007). L'animal viu s'ha retornat al medi. En cas de no trobar adults i metamòrfics s'ha procedit a cercar activament larves d'anurs i urodels en estat avançat de desenvolupament (\geq estat 40 de Gosner) pentinant la massa d'aigua en zig-zag amb el salabre (figura 6). S'han prioritzat les captures de les espècies més susceptibles als patògens analitzats, segons la bibliografia consultada.

Quan s'han capturat les larves s'han agafat *in situ* les mostres fent un frotis a l'aparell bucal amb un hisop estèril, en el cas dels anurs, i fent un frotis per tot el cos, en el cas dels urodels (figura 6). Les larves processades s'han alliberat al mateix punt on s'han trobat.

Els hisops s'han etiquetat (data, punt de mostreig, espècie, codi numèric individual, sexe, estat (viu o mort) i estadi de desenvolupament) (figura 6) i s'han guardat a la nevera portàtil.

En acabar el mostreig s'ha procedit a emplenar la fitxa de camp (ANNEX A-III), on s'han recollit les següents dades: Data, Codi localitat, hora, espècie, activitat, n° postes, n° adults, n° mascles, n° femelles, n° metamòrfics, n° indeterminats, n° larves, depredadors i observacions. Les etiquetes dels hisops han servit per emplenar una base de dades directament a l'excel, on s'han recollit les següents dades: Data, Codi localitat, espècie, codi numèric individual, sexe, estat (viu o mort), estadi de desenvolupament (larva, metamòrfic o adult), nom de la mostra, rèplica i observacions.

La conservació de les mostres s'ha portat a terme a una nevera convencional, on s'han mantingut a 4°C i s'han preservat fins que s'ha tingut una quantitat important de mostres (màxim 2 mesos). Després s'han portat fins al laboratori del C.R.A.R.C, i des d'allà s'han enviat mitjançant una empresa de transport amb vehicles refrigerats fins al laboratori de referència LABOKLIN per fer els anàlisis de PCR quantitativa (*nested PCR*) i detectar la presència/absència de DNA de 2 patògens en el cas dels anurs: Bd i Ranavirus, i 3 patògens en el cas dels urodels: Bsal, Bd, i Ranavirus.

En resum, les mostres s'han agafat segons aquestes prioritats:

- 1a: Mostres d'amfibis morts o moribunds (metamòrfics, adults i/o larves)
- 2a: Mostres d'amfibis adults vius
- 3a: Mostres de larves d'amfibi (mida mínima, 4 cm)

Els mostrejos s'han dividit en 3 fases

- Inicialment, al gener de 2018, s'ha fet un mostreig previ, capturant individus però sense agafar mostres, a cadascun dels punts de mostreig repartits per tot l'EIN (veure apartat 4; ÀREA D'ESTUDI). Aquesta visita ha servit per a detectar possibles larves hivernants d'espècies susceptibles a Bd com el tòtil (*Alytes obstetricans*) o la granota verda (*Pelophylax perezi*).

- A partir del mes de març de 2018 fins a mitjans de juny del mateix any s'han mostrejat altra vegada tots els punts de mostreig per tal d'obtenir, ara si, mostres d'escames dèrmiques mitjançant hisops i posteriorment portar-les a analitzar al laboratori.

- A finals de juny, tenint ja una part dels resultats dels anàlisis de laboratori, s'ha mostrejat la localitat "Celrà" (veure apartat 4; ÀREA D'ESTUDI) amb l'objectiu d'obtenir més mostres d'escames dèrmiques per a calcular la prevalença en diferents estacions de l'any d'una espècie que ha sortit positiva a Bd als primers anàlisis: el tòtil.



Buscant possible mortalitat d'amfibis.



Capturant amfibis amb salabre.



Passant l'hisop estèril per agafar mostra un urodel.



Passant l'hisop estèril per agafar mostra a un anur.



Granota pintada morta, conservada en etanol.



Etiquetant els hisops.

Figura 6: Fotografies de les diferents fases d'un mostreig de malalties emergents d'amfibis.

Pel que fa als anàlisis de laboratori, econòmicament molt costosos, inicialment no s'ha fet un anàlisi individual per a cadascun dels individus sinó que s'han enviat al laboratori mostres agrupades. Per tant, els anàlisis s'han fet agrupant varies mostres per a convertir-les en una sola mostra. Les agrupacions de mostres s'han fet sempre agrupant individus de la mateixa espècie i sense barrejar mostres entre localitats, tot i que siguin la mateixa espècie. D'aquesta manera s'ha obtingut un resultat positiu (+) o negatiu (-) per a cadascun dels patògens, de cadascuna de les espècie a cadascuna de les localitats.

El laboratori alemany que ha analitzat les mostres, LABOKLIN, ha entregat els resultats dels anàlisis en un període de 5-10 dies. La tècnica molecular emprada per LABOKLIN ha estat la PCR qualitativa o nested PCR, la qual només aporta dades de presència/absència del patògen a la mostra analitzada, però no informa sobre la càrrega d'espores/virus.

Fases dels anàlisis

- En una primera fase (del 8 de juny al 9 de juliol) s'han analitzat 22 mostres agrupades per espècie i localitat, les quals pertanyen a 98 individus diferents. Aquestes primeres mostres han servit per a esbrinar la presència/absència de patògens a l'àrea d'estudi.
- En una segona fase (8 d'agost de 2018), un cop s'han tingut els resultats de les 22 mostres analitzades, s'ha procedit a cercar la prevalença (% individus infectats en un moment donat) de Bd en una espècie susceptible, a una localitat concreta i en dos moments concrets. L'espècie i localitat escollides han estat el tòtil i la localitat Celrà, i els moments concrets han estat dues èpoques de l'any: finals d'hivern (09/03/2018) i principi d'estiu (26/6/2018). S'han analitzat 11 individus de tòtil, ja analitzats anteriorment, els quals se sap que les mostres agrupades han donat positiu a Bd a la primera fase, per tant vol dir que s'ha detectat DNA del patògen a la mostra.
- S'ha practicat la necròpsia dels animals morts detectats durant el projecte i s'ha realitzat histologia al laboratori del C.R.A.R.C. tenint cèl·lules de pell i observant-les al microscopi òptic (figura 7).



Figura 7: Fotografia del procés d'anàlisi histològic realitzat pel veterinari del C.R.A.R.C., Albert Martínez-Silvestre.

4- ÀREA D'ESTUDI

S'han escollit 7 punts de mostreig representatius (ANNEXOS A-I, MAPES; i A-II, FOTOGRAFIES) i repartits per tot el Massís per a realitzar les captures, obtenir les mostres i posteriorment poder fer els corresponents anàlisis de laboratori. A aquests 7 punts s'ha afegit una altra localitat, el Rissec a Madremanya, on el cos d'Agents Rurals ha detectat una granota pintada morta. Aquests punts escollits han estat tant ambients lenítics com lòtics (figura 8).



Figura 8: Mapa de l'EIN Massís de les Gavarres on es marquen els punts de mostreig i recollida de mostres. En verd, els hàbitats lenítics. En blau, els hàbitats lòtics. Província de Girona. Font: Elaboració pròpia a partir de Google Earth.

5- EL POBLAMENT D'AMFIBIS AL MASSÍS

Segons les bases de dades herpetològiques consultades i l'experiència de l'autor prèvia a l'estudi, a les localitats del projecte, i en general, al Massís de les Gavarres, es poden arribar a detectar un total d'11 espècies: 3 urodels i 8 anurs (taula 1). S'han fotografiat les espècies que s'han anat trobant (figura 9).

Codi	Urodels
L.he	Tritó palmat <i>Lissotriton helveticus</i> Razoumowsky, 1789
T.ma	Tritó verd <i>Triturus marmoratus</i> Latreille, 1800
S.sa	Salamandra <i>Salamandra salamandra</i> Linnaeus, 1758
Codi	Anurs
A.ob	Tòtil <i>Alytes obstetricans</i> Laurenti, 1768
B.spi	Gripau comú <i>Bufo spinosus</i> Linnaeus, 1758
D.pi	Granota pintada <i>Discoglossus pictus</i> Otth, 1837
E.ca	Gripau corredor <i>Epidalea calamita</i> Laurenti, 1768
H.me	Reineta <i>Hyla meridionalis</i> Boettger, 1874
P.cu	Gripau d'esperons <i>Pelobates cultripes</i> Cuvier, 1829
P.pu	Gripauet de punts <i>Pelodytes punctatus</i> Daudin, 1802
P.pe	Granota verda ibèrica <i>Pelophylax perezi</i> Seoane, 1885

Taula 1. Relació d'espècies d'amfibis que es poden detectar a l'àrea d'estudi.



Larva de Tòtil (*Alytes obstetricans*).



Larves de gripau comú (*Bufo spinosus*).



Larves de salamandra (*Salamandra salamandra*).



Adult de gripauet de punts (*Pelodytes punctatus*).



Adults de tritó verd (*Triturus marmoratus*).



Masclès de tritó palmat (*Lissotriton helveticus*).



Masclè de gripau d'esperons (*Pelobates cultripes*).



Adult mort de granota pintada (*Discoglossus pictus*).



Adult de gripau corredor (*Epidalea calamita*).



Adult de granota verda (*Pelophylax perezi*).

Figura 9: Fotografies de 10 de les 11 espècies capturades i analitzades al Massís de les Gavarres al llarg de l'estudi.

6- RESULTATS

6.1. RIQUESA D'AMFIBIS

Al llarg de tot l'estudi s'han aconseguit detectar les 11 espècies d'amfibis que habiten el Massís de les Gavarres (Taula 1).

Pel que fa a la riquesa d'espècies per localitats, la més elevada l'ha obtingut la localitat "Capçana", amb 7 espècies. La localitat "argilera" ha estat la segona amb més riquesa, 6 espècies. "Mas Salvador", "Can Puig" i "Daró" han obtingut una riquesa de 4 espècies. "Rissec" i "Madremanya" han obtingut la riquesa més baixa, amb 2 i 1 espècies respectivament (figura 10).

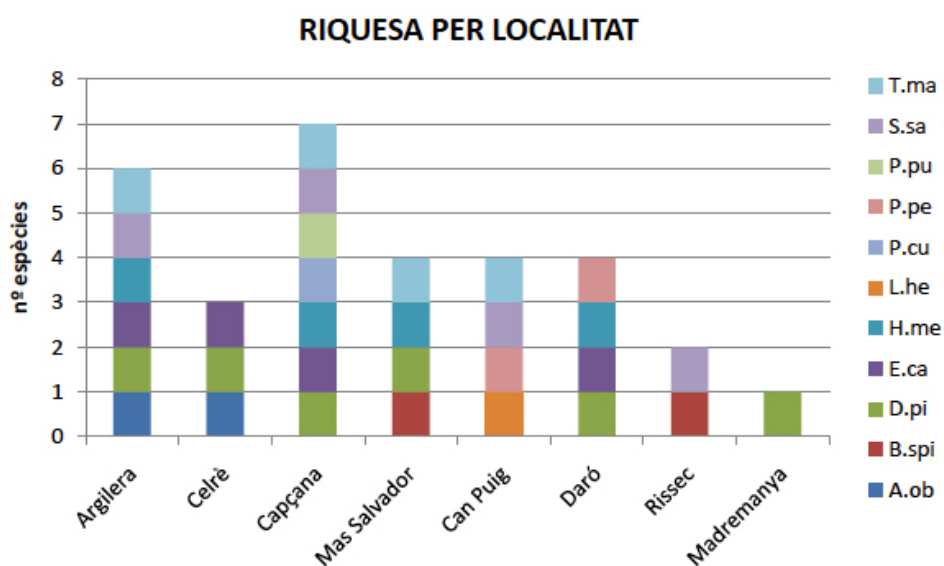


Figura 10: Riquesa d'amfibis detectada a les diferents localitats de mostreig.

Cal esmentar que aquest estudi no té com a objectiu avaluar la riquesa d'espècies a cada localitat. El resultat de riquesa de les diferents localitats està infravalorat, ja que quan s'han aconseguit les mostres per a fer els anàlisis de patògens s'ha detingut la cerca d'individus. Tot i així, s'ha cregut interessant reflectir a l'informe les espècies detectades a cada localitat, encara que algunes no s'hagin analitzat.

6.2. CAPTURES

S'han capturat més de 500 exemplars d'amfibis en tot el període d'estudi i al llarg de tot el Massís: 62 adults, 23 metamòrfics i més de 420 larves. Per tant, un percentatge molt gran de les captures han estat larves (83%). Els exemplars adults (12%) i metamòrfics (5%) han estat la minoria. (figura 11).

A més, també s'han capturat 17 crancs vermells americans (*Procambarus clarkii*) a la localitat "Celrà" per analitzar la seva possible funció ecològica com a vectors de patògens.

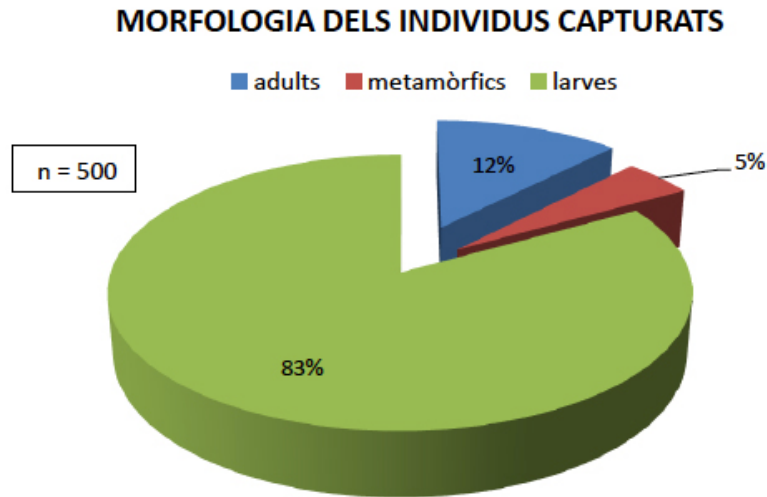


Figura 11: Percentatge d'individus adults, metamòrfics i larves capturats.

6.3. MOSTRES ANALITZADES

Dels més de 500 individus capturats s'han agafat mostres amb hisop estèril de 110 individus, contant les diferents morfologies detectades (larves, metamòrfics i adults). D'aquestes 110 mostres finalment se n'han analitzat 98. Per tant, podem dir que s'ha analitzat un 20% dels individus capturats (figura 12).

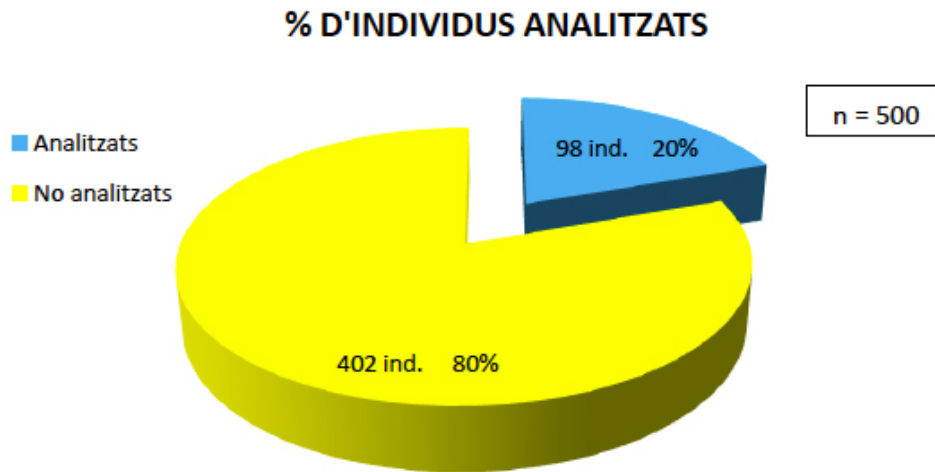


Figura 12: Percentatge d'individus analitzats i no analitzats a tota l'àrea d'estudi, tenint en compte totes les morfologies (adults, metamòrfics i larves).

Dels 98 individus que s'han analitzat, un 21% eren larves, un 16% eren metamòrfics i un 63% adults (figura 13), en contrast amb els percentatges de les diferents morfologies dels individus capturats (figura 11).

MORFOLOGIA DELS INDIVIDUS ANALITZATS

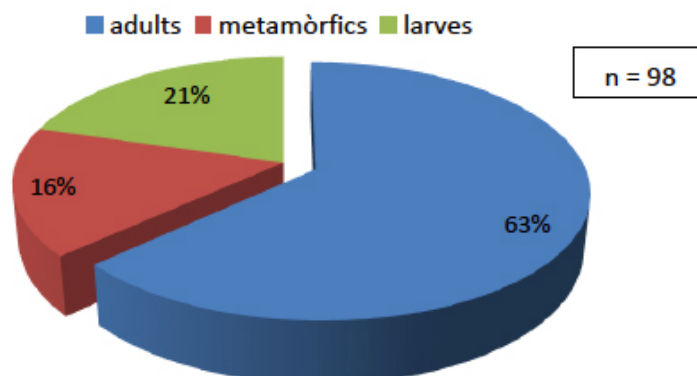


Figura 13: Percentatge d'individus adults, metamòrfics i larves analitzats.

A tots els adults capturats (100%) se'ls ha acabat agafant mostra i analitzant al laboratori. Pel que fa als metamòrfics, a més de dos terços dels que s'han capturat (69,57%) se'ls ha agafat mostra i posteriorment analitzat. Pel que fa a les larves, només s'ha agafat mostra i analitzat una mínima part de les capturades (4,52%). (figura 14).

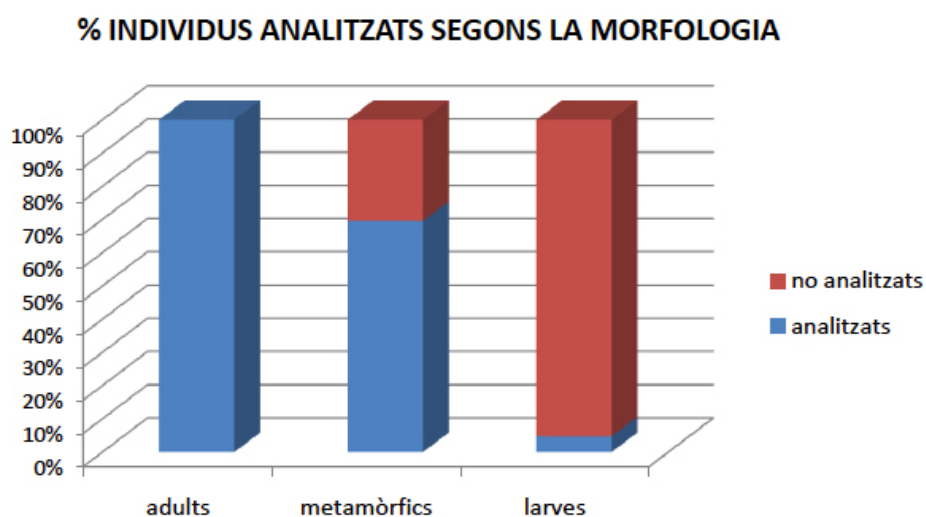


Figura 14: Percentatge d'individus analitzats i no analitzats segons la seva morfologia.

No s'ha fet un anàlisi individual per a cadascun dels 98 individus sinó que s'han enviat al laboratori mostres agrupades (veure apartat 3; METODOLOGIA).

Cronològicament s'han analitzat les següent mostres:

- 8 de juny de 2018 (52 amfibis en un total de 6 mostres agrupades):

- Capçana: 2 adults de granota pintada, un d'ells mort.
- Capçana: 1 adult de granota pintada, mort (el mateix).
- Argilera: 10 larves de salamandra.
- Celrà: 18 adults de gripau corredor.
- Celrà: 7 larves de tòtil.
- Can Puig: 14 adults i 1 larva de tritó verd.

- 22 de juny de 2018 (19 amfibis en un total de 6 mostres agrupades).

- Capçana: 2 adults de gripau corredor.
- Capçana: 1 adult de reineta.
- Capçana: 1 adult de gripau d'esperons.
- Capçana: 1 adult de gripauet de punts.
- Capçana: 6 adults de tritó verd.
- Can Puig: 8 adults de tritó palmat.

- 9 de Juliol de 2018 (27 amfibis i 17 crancs en un total de 10 mostres agrupades).

- Argilera: 1 adult de gripau corredor.
- Argilera: 1 adult de tritó verd.
- Celrà: 2 metamòrfics i 2 larves de tòtil.
- Celrà: 11 metamòrfics de granota pintada.
- Celrà: 17 adults de cranc americà.
- Can Puig: 1 adult de granota verda.
- Madremanya: 1 granota pintada, morta.
- Mas Salvador: 1 adult i 3 metamòrfics de granota pintada.
- Rissec: 3 adults de gripau comú.
- Daró: 1 adult de granota verda.

- 8 d'agost de 2018 (12 amfibis en un total de 12 mostres individuals).

- Celrà: 1 larva de tòtil (ja analitzat en mostra agrupada).
- Celrà: 1 larva de tòtil (ja analitzat en mostra agrupada).
- Celrà: 1 larva de tòtil (ja analitzat en mostra agrupada).
- Celrà: 1 larva de tòtil (ja analitzat en mostra agrupada).
- Celrà: 1 larva de tòtil (ja analitzat en mostra agrupada).
- Celrà: 1 larva de tòtil (ja analitzat en mostra agrupada).
- Celrà: 1 larva de tòtil (ja analitzat en mostra agrupada).
- Celrà: 1 larva de tòtil (ja analitzat en mostra agrupada).
- Celrà: 1 larva de tòtil (ja analitzat en mostra agrupada).
- Celrà: 1 metamòrfic de tòtil (ja analitzat en mostra agrupada).
- Celrà: 1 metamòrfic de tòtil (ja analitzat en mostra agrupada).
- Capçana: 1 adult de granota pintada, viu. (ja analitzat en mostra agrupada).

En una primera fase (del 8 de juny al 9 de juliol) (veure apartat 3; METODOLOGIA_Fases dels anàlisis) s'han analitzat un total de 22 mostres agrupades per espècie i localitat, les quals pertanyen a 98 individus diferents. Aquestes primeres mostres han servit per a esbrinar la presència/absència de patògens a l'àrea d'estudi.

Un cop s'han tingut els resultats de tots els individus analitzats a la primera fase s'ha procedit a fer una segona fase d'anàlisi per a cercar la prevalença (% individus infectats) de Bd en una espècie susceptible, a una localitat concreta i en un moment concret. El 8 d'agost s'han analitzat els 11 exemplars de tòtil capturats a la localitat "Celrà", aquesta vegada analitzant individualment cada exemplar i no en mostres agrupades. Per tant, s'han analitzat 11 individus ja analitzats anteriorment i els quals se sap que les mostres agrupades han donat positiu a Bd a la primera fase. Fins aquí se sap que alguns exemplars estan infectats, però no se sap quina proporció. Més endavant es donen detalls dels % d'individus infectats a cada època de l'any estudiada (finals d'hivern i principi d'estiu) (veure apartat 6.7; RESULTATS_Prevalença).

En total s'han analitzat 34 mostres que pertanyen a 98 individus. A més, també s'han agafat mostres de l'esquelet extern de 17 crancs americans (*Procambarus clarkii*) de la localitat "Celrà" (figura 31) i s'han analitzat, donant resultat negatiu als 2 patògens analitzats (taula 4).

Contant tota l'àrea d'estudi, s'ha analitzat un número d'individus diferent per a cada espècie. El tritó verd ha estat l'espècie a la qual s'han analitzat més exemplars, un 23% del total. Un 22% dels individus analitzats han estat de gripau corredor. Un 18% de granota pintada, un 11% de tòtil, un 10% de salamandra, un 8% de tritó palmat, un 3% de gripau comú, un 2% de granota verda, un 1% de gripauet de punts, un 1% de gripau d'esperons i un 1% de reineta (figura 15). Pel que fa a percentatges entre anurs i urodels, un 41% dels analitzats han estat urodels (lletra groga), i un 59% anurs (lletra negra) (figura 15).

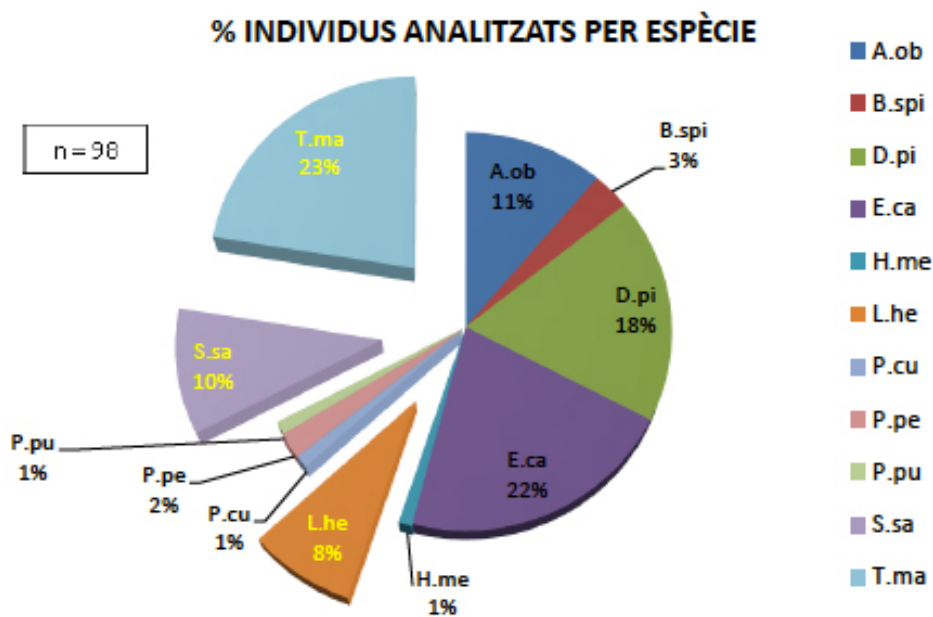


Figura 15: Percentatge d'exemplars de cada espècie analitzats a tota l'àrea d'estudi.

No s'han analitzat els mateixos individus a totes les localitats, ja que les captures han estat diferents a cadascuna d'elles. A la localitat on més individus s'han analitzat ha estat la localitat "Celrà", 40 individus, seguida de "Can Puig", amb 23 individus. A les localitats "Capçana" i "Argilera" s'han analitzat 13 i 12 individus respectivament. A "Mas Salvador" se n'han analitzat 4. Al "Rissec" 3 individus, i per últim, al "Daró" i a "Madremanya" només 1 (figura 16).

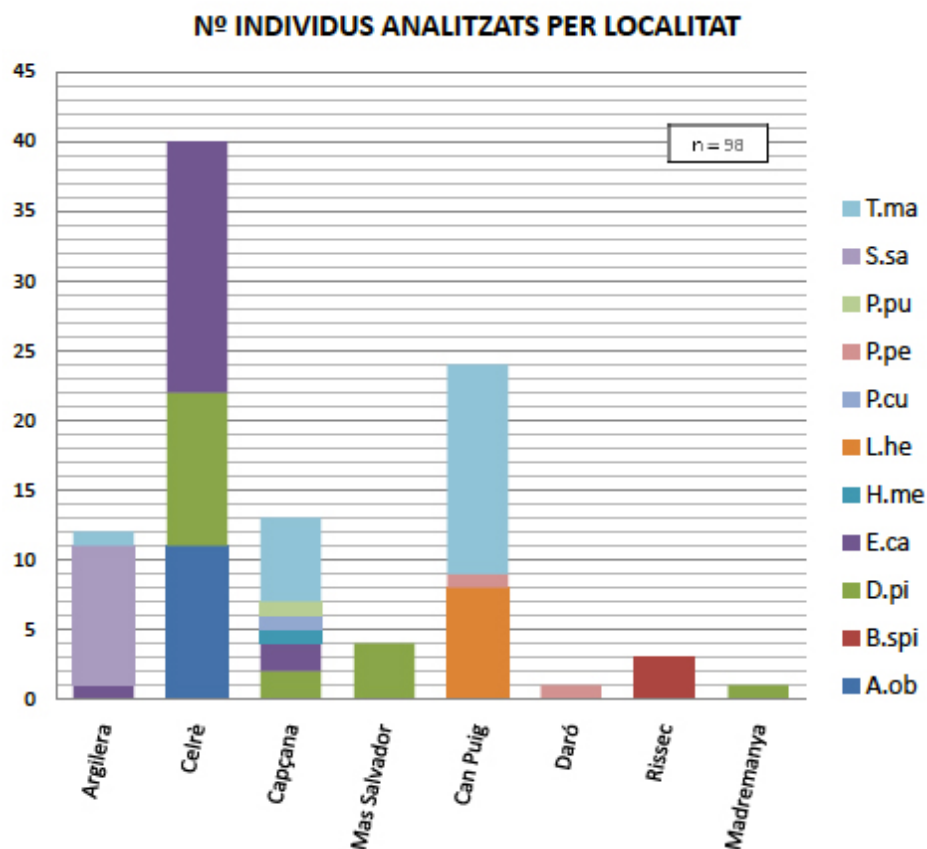


Figura 16: Número d'individus de les diferents espècies analitzats a cadascuna de les localitats de l'àrea d'estudi.

No s'han analitzat totes les espècies capturades a cada localitat, ja que en algunes espècies (*Bufo spinosus*, *Discoglossus pictus*, *Hyla meridionalis*, ...) només s'han detectat larves. Aquestes espècies, quan són larves, tenen el disc oral molt estret i no se'ls ha pogut passar l'hisop degut al perill de malferir-les. Un altre mètode per a detectar quitridiomicosi, fins fa ben poc, era fotografiar el disc oral de les larves i detectar malformacions en aquesta part del cos. Si es trobava una malformació o desqueratinització al disc oral de les larves es diagnosticava l'animal amb quitridiomicosi, però un estudi molt recent (Navarro-Lozano *et al.*, 2018) conclou que les deformitats del disc oral de les larves d'amfibis no es pot fer servir com a únic diagnòstic per a la quitridiomicosi, contràriament al que es creia quan es va pensar la metodologia del present estudi. Abans que es publicués l'estudi de Navarro-Lozano *et al.*, 2018, es creia que si es trobava una deformitat en el disc oral de les larves era una senyal inequívoca de que la larva estava infectada amb Bd, per aquest motiu el present estudi es va voler basar en aquest mètode d'identificació de la quitridiomicosi a les larves de petita mida, però en confirmar-se que aquest mètode era erroni es va desestimar i no s'han pogut analitzar algunes espècies

en certes localitats. La única manera seria sacrificant les larves, i ni l'autor ni l'administració que atorga l'autorització de captura científica han trobat pertinent aquest mètode, partint de la base que els amfibis autòctons són vertebrats protegits i amenaçats.

Pel que fa al percentatge d'espècies analitzades a cada localitat, a "Celrà" i "Madremanya" si que s'han analitzat un 100% de les espècies detectades, a la "Capçana" un 85,7%, a "Can Puig" un 75%, a les localitats "Argilera" i Rissec" un 50%, i per últim a "Mas Salvador" i el "Daró" un 25%. S'ha elaborat un gràfic comparatiu per esbrinar el % d'espècies analitzades a cada localitat (figura 17).

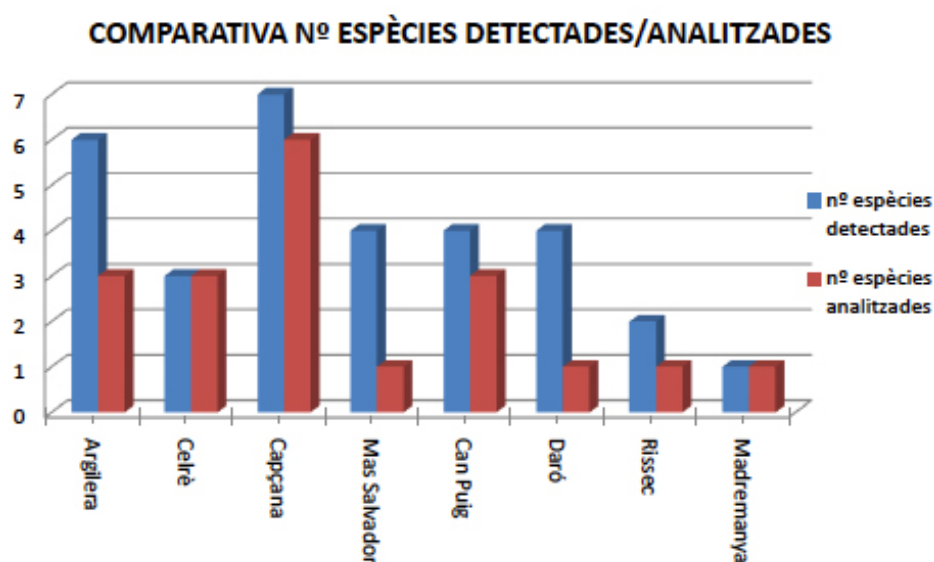


Figura 17: Número d'espècies detectades i analitzades a les diferents localitats.

S'ha elaborat una taula per a cada localitat, on es resumeixen les mostres analitzades al laboratori. En aquestes taules s'inclou la següent informació: Data de la mostra, Data de l'anàlisi, espècie, número d'individus, morfologia (adult, metamòrfic o larva), número de morts, tipus de mostra, histologia (sí o no), Ranavirus (+ o -), Bd (+ o -), i Bsal (+ o -) (taules 2 a 9).

A la localitat "Capçana" s'han analitzat 6 espècies i només dues d'aquestes han resultat ser positives a Bd: la granota pintada (*Discoglossus pictus*) i la reineta (*Hyla meridionalis*). Pel que fa a la granota pintada, un dels individus s'ha trobat viu i l'altre mort. Com la mostra agrupada de tritó verd ha donat negativa a Bd no s'ha fet histologia de la muda de pell recollida de l'individu nº4. Pel que fa als altres dos patògens analitzats al laboratori, Bsal i Ranavirus, cap espècie ha resultat estar infectada (taula 2). D'altra banda, s'ha observat un tritó verd adult amb una vesícula al dors (figura 21), presumiblement causada per un dermocistidi (veure apartat 6.4.4; RESULTATS_altres patògens: dermocistidi).

DATA MOSTRA	DATA ANÀLISI	ESPÈCIE	Nº INDIV.	MORFOLOGIA	Nº MORTS	TIPUS MOSTRA	HISTOLOGIA	RANA VIRUS	Bd	Bsal
12/04/18	08/06/18	Granota pintada	1	ADULT	1	Hisop i animal sencer	SI	-	+	
12/04/18	08/08/18	Granota pintada	1	ADULT	0	Hisop	NO	-	+	
12/04/18	22/06/18	Gripau corredor	2	ADULT	0	Hisop	NO	-	-	
12/04/18	22/06/18	Reineta	1	ADULT	0	Hisop	NO	-	+	
12/04/18	22/06/18	Gripau d'esperons	1	ADULT	0	Hisop	NO	-	-	
12/04/18	22/06/18	Gripauet de punts	1	ADULT	0	Hisop	NO	-	-	
12/04/18	22/06/18	Tritó verd	6	ADULT	0	Hisop i Muda pell (ind. 4)	NO	-	-	-

Taula 2: Resum de les mostres analitzades a la localitat "Capçana". Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*. Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*. En vermell, presència del patogen = (+). En verd, absència del patogen (-).

A la localitat "Argilera" s'han analitzat 3 espècies i dues d'aquestes han resultat ser positives a Bd, el gripau corredor (*Epidalea calamita*) i el tritó verd (*Triturus marmoratus*). Pel que fa a Bsal i a Ranavirus, les 3 espècies han donat negatiu en els anàlisis (taula 3).

DATA MOSTRA	DATA ANÀLISI	ESPÈCIE	Nº INDIV.	MORFOLOGIA	Nº MORTS	TIPUS MOSTRA	HISTOLOGIA	RANA VIRUS	Bd	Bsal
09/04/18	09/07/18	Gripau corredor	1	ADULT	0	Hisop	NO	-	+	
09/04/18	09/07/18	Tritó verd	1	ADULT	0	Hisop	NO	-	+	-
09/04/18	08/06/18	Salamandra	10	LARVA	0	Hisop	NO	-	-	-

Taula 3: Resum de les mostres analitzades a la localitat "Argilera". Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*. Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*. En vermell, presència del patògen = (+). En verd, absència del patògen (-).

A la localitat "Celrà" s'han analitzat 3 espècies i només el tòtil (*Alytes obstetricans*) ha donat positiu a Bd. La resta de patògens analitzats han resultat absents (taula 4).

DATA MOSTRA	DATA ANÀLISI	ESPÈCIE	Nº INDIV.	MORFOLOGIA	Nº MORTS	TIPUS MOSTRA	HISTOLOGIA	RANA VIRUS	Bd	Bsal
03/04/18	08/06/18	Gripau corredor	18	ADULT	0	Hisop	NO	-	-	
09/03/18	08/06/18	Tòtil	7	LARVA	0	Hisop	NO	-	+	
26/06/18	09/07/18	Tòtil	2	LARVA	0	Hisop	NO	-	+	
26/06/18		Tòtil	2	METAM.						
26/06/18	09/07/18	Granota pintada	11	METAM.	0	Hisop	NO	-	-	
26/06/18	09/07/18	Cranc americà	17	ADULT	0	Hisop	NO	-	-	

Taula 4: Resum de les mostres analitzades a la localitat "Celrà". Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*. Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*. En vermell, presència del patògen = (+). En verd, absència del patògen (-).

A la localitat "Can Puig" s'han analitzat 3 espècies i cap d'aquestes ha donat positiu a cap dels 3 patògens analitzats al laboratori (taula 5). A més, s'han observat vesícules típiques de dermocistidi a 6 dels 8 tritons palmats capturats (figura 20) (veure apartat 6.4.4; RESULTATS altres patògens: dermocistidi).

DATA MOSTRA	DATA ANÀLISI	ESPÈCIE	Nº INDIV.	MORFO LOGIA	Nº MORTS	TIPUS MOSTRA	HISTO LOGIA	RANA VIRUS	Bd	Bsal
08/03/18	22/06/18	Tritó palmat	8	ADULT	0	Hisop	NO	-	-	-
08/03/18	08/06/18	Tritó verd	14	ADULT	0	Hisop	NO	-	-	-
08/03/18		Tritó verd	1	LARVA	0	Hisop	NO	-	-	-
08/03/18	09/07/18	Granota verda	1	ADULT	0	Hisop	NO	-	-	-

Taula 5: Resum de les mostres analitzades a la localitat "Can Puig". Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*. Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*. En verd, absència del patogen (-).

A la localitat "Madremanya" s'ha analitzat només un individu mort de granota pintada (*Discoglossus pictus*) (figura 34), i ha donat positiu a Bd. Pel que fa a Ranavirus, el resultat ha estat negatiu (taula 6).

DATA MOSTRA	DATA ANÀLISI	ESPÈCIE	Nº INDIV.	MORFO LOGIA	Nº MORTS	TIPUS MOSTRA	HISTO LOGIA	RANA VIRUS	Bd	Bsal
09/03/18	09/07/18	Granota pintada	1	ADULT	1	Hisop + animal sencer	SI	-	+	-

Taula 6: Resum de les mostres analitzades a la localitat "Madremanya". Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*. Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*. En vermell, presència del patogen = (+). En verd, absència del patogen (-).

A la localitat "Mas salvador" s'ha analitzat 1 espècie, la granota pintada (*Discoglossus pictus*) i no ha donat positiu a cap dels 2 patògens analitzats (taula 7).

DATA MOSTRA	DATA ANÀLISI	ESPÈCIE	Nº INDIV.	MORFO LOGIA	Nº MORTS	TIPUS MOSTRA	HISTO LOGIA	RANA VIRUS	Bd	Bsal
11/06/18	09/07/18	Granota pintada	3	METAM	0	Hisop	NO	-	-	-
13/06/18		Granota pintada	1	ADULT	0	Hisop	NO	-	-	-

Taula 7: Resum de les mostres analitzades a la localitat "Mas Salvador". Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*. Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*. En verd, absència del patogen (-).

A la localitat "Rissec" s'han analitzat 3 individus de gripau comú (*Bufo spinosus*) i la mostra agrupada no ha donat positiu a cap dels 2 patògens analitzats (taula 8).

DATA MOSTRA	DATA ANÀLISI	ESPÈCIE	Nº INDIV.	MORFOLOGIA	Nº MORTS	TIPUS MOSTRA	HISTOLOGIA	RANA VIRUS	Bd	Bsal
11/06/18	09/07/18	Gripau comú	3	ADULT	0	Hisop	NO	-	-	

Taula 8: Resum de les mostres analitzades a la localitat "Rissec". Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*. Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*. En verd, absència del patogen (-).

A la localitat "Daró" s'ha analitzat 1 espècie, la granota verda (*Pelophylax perezi*) cap dels 2 patògens analitzats (taula 9).

DATA MOSTRA	DATA ANÀLISI	ESPÈCIE	Nº INDIV.	MORFOLOGIA	Nº MORTS	TIPUS MOSTRA	HISTOLOGIA	RANA VIRUS	Bd	Bsal
11/06/18	09/07/18	Granota verda	1	ADULT	0	Hisop	NO	-	-	

Taula 9: Resum de les mostres analitzades a la localitat "Daró". Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*. Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*. En verd, absència del patogen (-).

6.4. PRESENÇA DE PATÒGENS EN AMFIBIS

S'ha analitzat la presència de patògens a totes les espècies d'amfíbis presents al Massís de les Gavarres (taula 10). Els 3 patògens analitzats al laboratori han estat: *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) i *Ranavirus*. El Bd i el Ranavirus s'han analitzat a totes les mostres d'amfíbis recollides, mentre que el Bsal només s'ha analitzat en mostres d'urodels. A més, s'ha observat la presència d'una nova patologia d'amfíbis, molt probablement provocada per un microorganisme del regne dels protists, un dermocistidi (Dc) paràsit d'amfíbis (veure apartat 2; INTRODUCCIÓ) al qual no se li ha pogut assignar cap espècie en concret, ja que per a saber l'espècie de la qual es tracta s'ha d'agafar una mostra de teixit de la mateixa vesícula de l'animal i això no ha estat possible.

Els anàlisis de laboratori han corroborat la presència del patogen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) al Massís de les Gavarres. També s'ha comprovat l'absència de *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) i *Ranavirus* als punts d'aigua del Massís estudiats. D'altra banda, s'ha descobert la presència de tritons amb simptomatologia (vesícules) típica d'un nou paràsit d'amfíbis, el dermocistidi, amb un únic cas publicat a Catalunya (Martínez-Solvestre *et al.*, 2017).

El tòtil (*Alytes obstetricans*), el tritó verd (*Triturus marmoratus*), la reineta (*Hyla meridionalis*), la granota pintada (*Discoglossus pictus*) i el gripau corredor (*Epidalea calamita*) han estat les espècies infectades per Bd si s'engloba tota l'àrea d'estudi (taula 10).

El tritó palmat (*Lissotriton helveticus*) i el tritó verd (*Triturus marmoratus*) han estat les espècies on s'han observat vesícules probablement provocades per dermocistidis (Taula 10).

Espècies presents a les Gavarres	Detectada	Anàlisi de patògens	Bd	Bsal	Ranavirus	Dc
Tòtil	Sí	Sí	+		-	-
Salamandra	Sí	Sí	-	-	-	-
Gripauet de punts	Sí	Sí	-		-	-
Gripau d'esperons	Sí	Sí	-		-	-
Granota verda	Sí	Sí	-		-	-
Tritó palmat	Sí	Sí	-	-	-	+
Tritó verd	Sí	Sí	+	-	-	+
Gripau comú	Sí	Sí	-		-	-
Reineta	Sí	Sí	+		-	-
Granota pintada	Sí	Sí	+		-	-
Gripau corredor	Sí	Sí	+		-	-

Taula 10: Resum de les espècies detectades i analitzades a tota l'àrea d'estudi. El signe (+) denota que s'ha trobat DNA del patògen corresponent a alguna de les mostres mitjançant la tècnica molecular PCR qualitativa. El signe (-) denota un resultat negatiu, no s'ha detectat DNA del patògen a cap mostra analitzada. Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*. Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*. Dc = *Dermocistidi*.

6.4.1. *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)

S'ha pogut calcular el percentatge d'espècies en què s'ha trobat Bd, gràcies a haver pogut agafar mostres de totes les espècies del Massís. Un 45,45% de les espècies analitzades han donat resultats positius al fong quítrid Bd (figura 18).

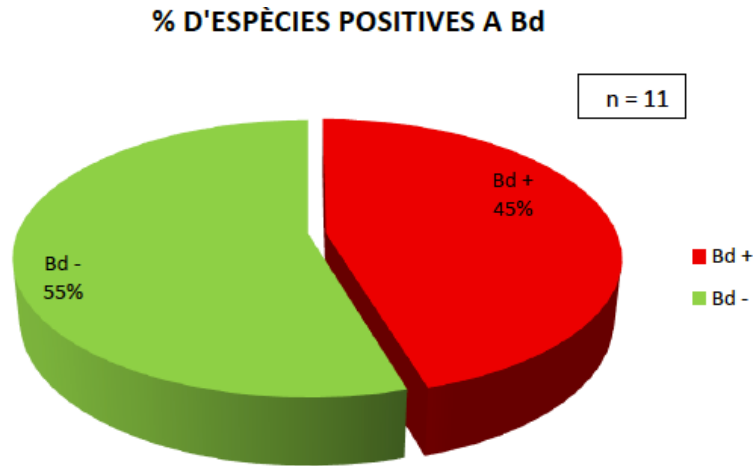


Figura 18: Percentatge d'espècies positives i negatives a Bd, tenint en compte les 11 espècies presents al Massís de les Gavarres. "Bd-" = *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) està absent. "Bd +" = *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) està present.

La proporció d'individus infectats més gran l'ha obtingut la reineta, amb un 100% d'individus infectats, però si és té en compte que només s'ha analitzat un individu, aquesta dada queda sense valor estadístic, ja que la mostra és molt petita. El tòtil ha obtingut un valor d'un 63,63% d'animals infectats (n=11). L'ha seguit la granota pintada, amb un 16,67% d'individus infectats (n=18), el gripau corredor amb un 4,76% (n=21) i el tritó verd amb un 4,55% (n=22) (figura 19).

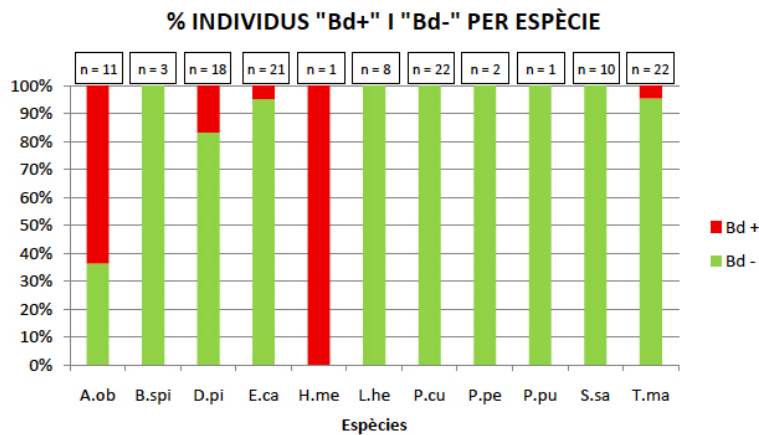


Figura 19: En vermell, percentatge d'individus de cada espècie infectats amb *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd+). En verd, percentatge d'individus no infectats amb *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd-).

6.4.2. *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal)

No s'ha detectat la presència d'un altre fong quítrid, *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) (Martel *et al.*, 2013), descrit per a la ciència al 2013, i que s'està estenent per Europa i afecta a urodels.

Del total d'amfibis analitzats un 41% eren urodels (figura 15) i cap mostra ha donat resultats positius a Bsal. Tot i que els resultats són esperançadors no es pot afirmar que no hi sigui present al Massís, ja que un resultat negatiu a l'anàlisi de laboratori no indica l'absència del patògen, simplement indica que no s'ha detectat a la PCR. Així ho adverteix LABOKLIN als informes dels anàlisis.

6.4.3. Ranavirus

A cap de les 98 mostres analitzades ha aparegut aquest virus (taula 10). Segons aquests resultats semblaria que es podria considerar absent a les localitats de mostreig analitzades, però tal i com s'ha mencionat per Bsal, un resultat negatiu a l'anàlisi de laboratori no indica l'absència del patògen, simplement indica que no s'ha detectat.

6.4.4. Altres patògens: dermocistidis

S'ha constatat la presència d'una altra patologia d'amfibis al Massís de les Gavarres, la simptomatologia de la qual són unes vesícules cutànies detectades, sobretot, a la zona costal i dorsal del cos i al lateral de la cua de l'animal. Aquestes estructures han estat localitzades, de moment, només en urodels. Tot i que només es tenen proves fotogràfiques de les vesícules (figures 20 i 21) molt probablement estan provocades per un microorganisme del regne dels protists, un dermocistidi, ja que les lesions macroscòpiques trobades als tritons afectats són molt similars a altres casos de dermocistidi publicats (Diego-Rasilla, 2017), (Galán & Dopeiro, 2017) (Martínez-Silvestre *et al.*, 2017). Aquesta afecció ha aparegut a les localitats de "Can Puig" i "Capçana". A Can Puig s'han detectat vesícules a 6 individus de tritó palmat (*Lissotriton helveticus*) (figura 20). Se'ls ha fotografiat, se'ls ha agafat mostra amb hisop i se'ls ha alliberat al mateix lloc on s'han capturat.

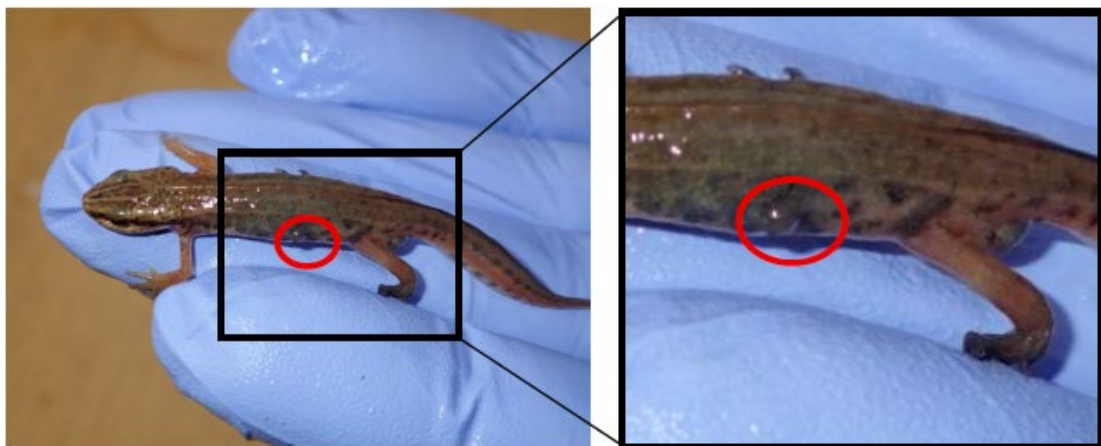


Figura 20: Fotografia d'una vesícula de dermocistidi sobre *Lissotriton helveticus* a la localitat "Can Puig".

A la Capçana s'ha detectat només una vesícula al dors d'un exemplar femella de tritó verd (*Triturus marmoratus*) (figura 21). Aquest animal ha estat traslladat al C.R.A.R.C. a través dels Agents Rurals (veure apartat 3; METODOLOGIA), però quan ha arribat al laboratori la vesícula havia desaparegut. Un cop allà, i seguint el criteri del veterinari responsable del centre, se li ha practicat eutanàsia. Llavors se l'ha analitzat mitjançant una histologia per a fer un examen microscòpic i comprovar si al dors de l'animal, on estava la vesícula, s'hi veien estructures que poguessin determinar que la lesió havia estat generada per un dermocistidi. Martínez-Silvestre *et al.*, 2017 han determinat amb la histologia que les vesícules trobades sobre un tritó palmat eren conseqüència d'una infecció per dermocistidis, però encara no s'ha pogut determinar l'espècie del paràsit. Tot i l'esforç per a confirmar clínicament de quina patologia es tracta, a la histologia no s'ha pogut veure cap estructura sospitosa (endòspora, macròfag, ...) que afirmés que es tracta d'un dermocistidi (Martínez-Silvestre, com. pers.). A les PCR realitzades inicialment amb els hisops no s'ha buscat ADN d'aquest dermocistidi, ja que no se sospitava de la seva existència. Per tant, en aquest estudi només s'han recollit proves fotogràfiques i morfològiques d'aquest patogen, però no s'ha pogut demostrar clínicament de quina espècie es tracta.



Figura 21: Fotografia d'una vesícula de dermocistidi sobre *Triturus marmoratus* a la localitat "Capçana".

6.5. PRESENCIA DE PATÒGENS A LES DIFERENTS LOCALITATS

6.5.1. Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)

Aquest patògen ha estat detectat a un 50% de les localitats analitzades (figura 22). Això no vol dir que no hi sigui a més localitats de les que s'ha detectat, sinó que simplement ha sortit un resultat negatiu, però això no implica que no hi sigui, tal i com s'afirma als informes de LABOKLIN, laboratori de referència que ha analitzat les mostres.

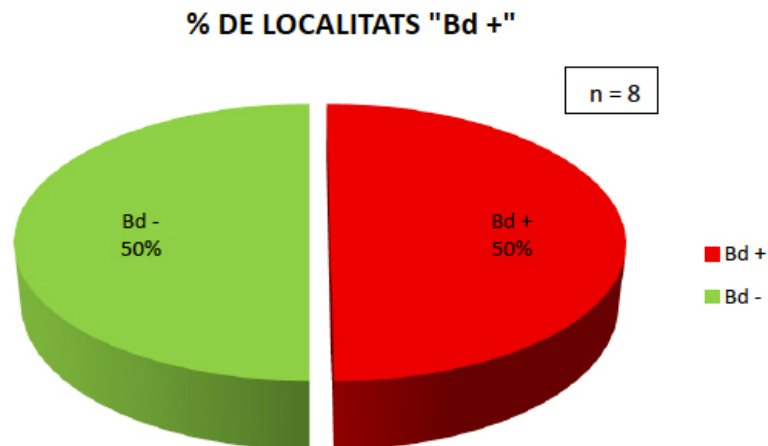


Figura 22: Percentatge de localitats que han obtingut resultats positius a Bd, tenint en compte totes les espècies analitzades a cada localitat. En vermell, % localitats amb presència de Bd. En verd, % de localitats amb absència de Bd.

L'Argilera i la Capçana han estat les localitats amb més espècies positives a Bd; s'han detectat 2 espècies amb resultats positius a Bd a les localitats "Argilera" (tritó verd i gripau corredor) i "Capçana" (reineta i granota pintada), i una espècie positiva al fong a les localitats "Celrà" (tòtil) i "Madremanya" (granota pintada) (figura 23).

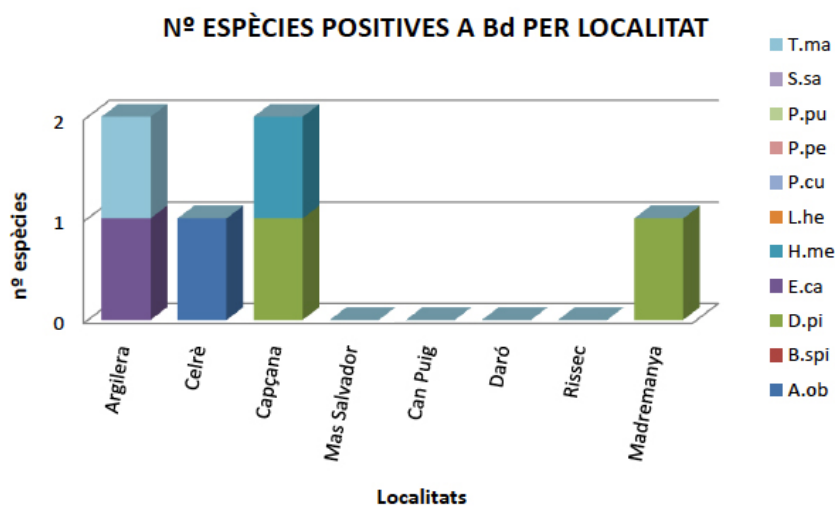


Figura 23: Número d'espècies positives a Bd a les diferents localitats de mostreig.

A la localitat "Argilera" les larves de salamandra (*Salamandra salamandra*), capturades en medi aquàtic a la primavera i presents a l'aigua des de la tardor, han donat negatiu als anàlisis de laboratori. En canvi, tant l'adult de gripau corredor (*Epidalea calamita*), recent vingut al medi aquàtic per a reproduir-se, com l'adult de tritó verd (*Triturus marmoratus*) capturat a la primavera en medi aquàtic, i probablement des de fa mesos en fase aquàtica, han donat positiu (figura 24).

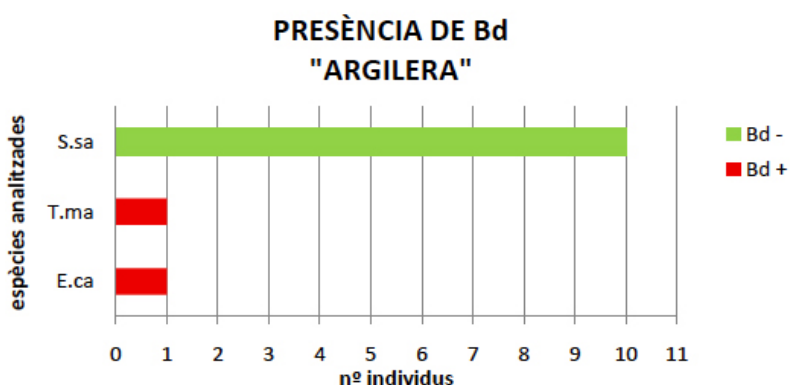


Figura 24: Presència de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) a la localitat Celrà. En verd, individus amb resultat negatiu a Bd (Bd -). En vermell, individus positius a Bd (Bd +).

Pel que fa a la localitat "Celrà", tant els 18 adults de gripau corredor capturats a primavera, recent arribats al medi aquàtic per a reproduir-se, com els 11 metamòrfics de granota pintada (*Discoglossus pictus*) capturats a l'estiu, recent emergits del medi aquàtic però ja en medi terrestre, han donat negatiu als anàlisis de Bd. En canvi, 6 de 7 larves de tòtil (*Alytes obstetricans*) capturats a l'hivern en medi aquàtic, i un metamòrfic de la mateixa espècie capturat ja al medi terrestre, sota una pedra, han donat positiu als anàlisis de Bd. (figura 25). Les 2 larves de tòtil capturades a l'estiu han donat negatiu a Bd. (veure apartat 6.7; RESULTATS_Prevaleça).

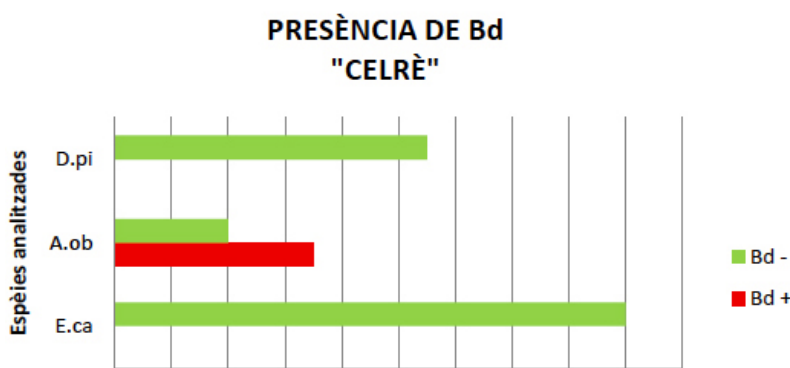


Figura 25: Presència de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) a la localitat Celrà. En verd, individus amb resultat negatiu a Bd (Bd -). En vermell, individus positius a Bd (Bd +).

A la localitat "Capçana" els 2 adults de granota pintada (*Discoglossus pictus*), detectats a la primavera i en medi aquàtic, han donat positiu en els anàlisis de Bd. Un d'aquests s'ha trobat mort. A més, un mascle de reineta capturat en medi aquàtic també ha donat positiu a Bd. Els 6 adults de tritó verd (*Triturus marmoratus*), capturats en medi aquàtic i en fase aquàtica des de fa mesos, han resultat ser negatius a Bd. Pel que fa als altres anurs detectats, tant el gripau d'esperons (*Pelobates cultripes*) com el gripauet de punts (*Pelodytes punctatus*) i la parella de gripau corredor (*Epidalea calamita*) han donat negatiu a la prova de Bd (figura 26). Els exemplars d'aquestes últimes 3 espècies han estat també capturats dins l'aigua.

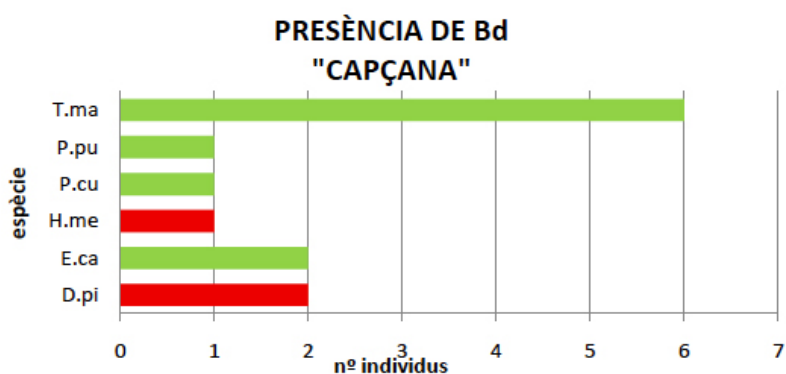


Figura 26: Presència de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) a la localitat Celrà. En verd, individus amb resultat negatiu a Bd (Bd -). En vermell, individus positius a Bd (Bd +).

A la localitat "Argilera" han donat positiu a Bd un 16,67% dels individus. A "Celrà" un 17,5% han sortit positius. A "Capçana" un 23,07%, a "Mas Salvador", "Can Puig", "Daró" i "Rissec", un 0%. "Madremanya" han sortit un 100% d'infectats, però és una excepció, ja que només s'ha analitzat un individu mort, que ha resultat ser positiu (figura 27).

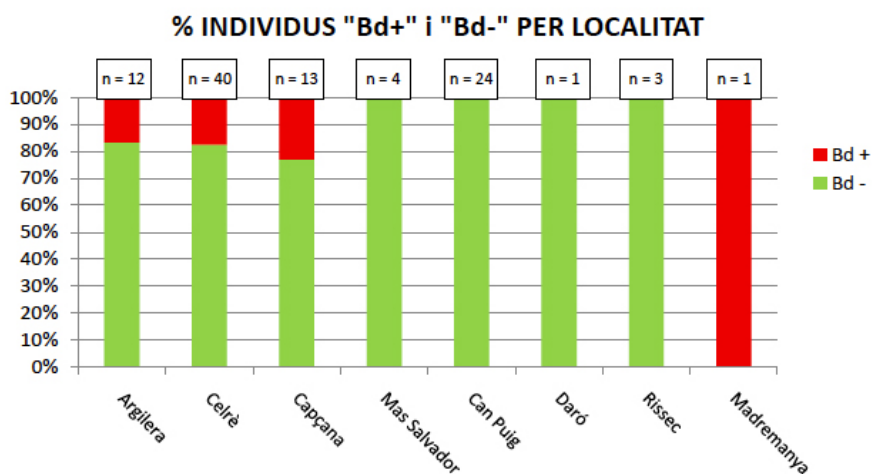


Figura 27: Percentatge d'individus infectats amb *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd+) i no infectats amb *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd-) a cada localitat de mostreig, tenint en compte totes les espècies analitzades. En verd, % no infectats. En vermell, % infectats.

6.5.2. *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal)

No s'ha detectat presència de Bsal a cap de les 3 localitats en què s'han fet anàlisis d'aquest fong (figura 28). S'ha analitzat a les 3 localitats on s'han detectat urodels, ja que aquest patogen afecta majoritàriament a aquest grup d'amfibis, i si no es troba amb urodels, amb menys probabilitat es trobarà en anurs.

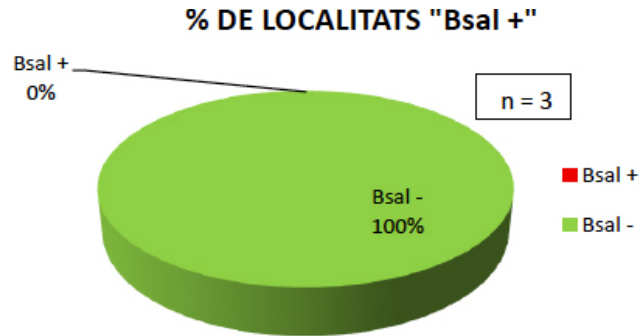


Figura 28: Percentatge de localitats que han obtingut resultats positius a Bsal, tenint en compte totes les espècies d'urodels analitzades a cada localitat. En vermell, % localitats amb presència de Bsal. En verd, % de localitats amb absència de Bsal.

6.5.3. Ranavirus

No s'ha detectat presència de Ranavirus a cap de les 8 localitats estudiades (figura 29).

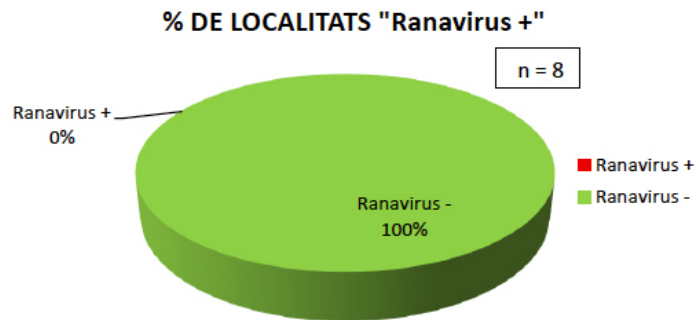


Figura 29: Percentatge de localitats que han obtingut resultats positius a Ranavirus, tenint en compte totes les espècies analitzades a cada localitat. En vermell, % localitats amb presència de Ranavirus. En verd, % de localitats amb absència de Ranavirus.

6.5.4. Altres patògens: dermocistidis

S'han detectat vesícules presumptament provocades per dermocistidis a un 25% de les localitats mostrejades (figura 30). Les localitats afectades per aquest patogen han estat la localitat "Capçana" i, sobretot, la localitat "Can Puig".

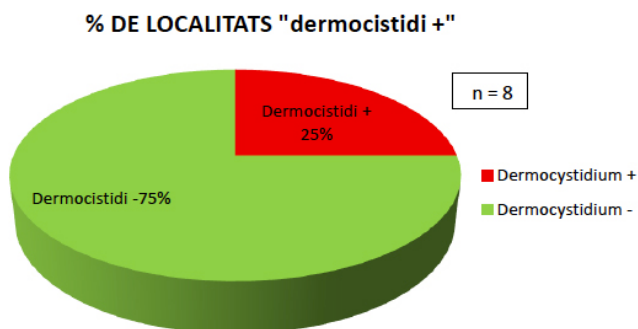


Figura 30: Percentatge de localitats que han obtingut resultats positius a dermocistidis, tenint en compte totes les espècies capturades a cada localitat. En vermell, % localitats amb presència de dermocistidis. En verd, % de localitats amb absència de dermocistidis.

6.6. PRESENCIA DE PATÒGENS EN POSSIBLES RESERVORIS

Tant els anàlisis de Bd com els de Ranavirus han sortit negatius als 17 crancs analitzats. Aquest resultat només ens indica que els decàpodes no portaven espores a l'exoesquelet. Cal recalcar que els hisops només s'han passat per l'exosquelet dels crancs (figura 31), i no pel tracte digestiu.



Figura 31: Agafant mostra de cranc vermell americà (*Procambarus clarkii*).

6.7. PREVALENÇA

En epidemiologia, la prevalença descriu la proporció d'individus (%) d'una espècie en una mateixa població i en un moment determinat infectats per una malaltia. Es pot equiparar a una fotografia de l'estat de la malaltia que s'està estudiant.

6.7.1. *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)

La prevalença d'infecció de l'espècie susceptible escollida, el tòtil (*Alytes obstetricans*), pel punt "Celrà" ha variat força d'una estació de l'any a l'altra. Els resultats de prevalença a l'hivern han estat d'un 87,5% d'individus infectats (n=7) i, en canvi, a l'estiu, només d'un 25% (n=4) (taula 11), (figura 32).

DATA MOSTRA	DATA ANÀLISI	ESPÈCIE	Nº INDIV.	CODI INDIV.	ESTACIÓ	MORFOLOGIA	Nº MORTS	TIPUS MOSTRA	Bd
09/03/18	08/08/18	A.OB	1	1	HIVERN	LARVA	0	Hisop	+
09/03/18	08/08/18	A.OB	1	2	HIVERN	LARVA	0	Hisop	-
09/03/18	08/08/18	A.OB	1	3	HIVERN	LARVA	0	Hisop	+
09/03/18	08/08/18	A.OB	1	4	HIVERN	LARVA	0	Hisop	+
09/03/18	08/08/18	A.OB	1	5	HIVERN	LARVA	0	Hisop	+
09/03/18	08/08/18	A.OB	1	6	HIVERN	LARVA	0	Hisop	+
09/03/18	08/08/18	A.OB	1	7	HIVERN	LARVA	0	Hisop	+
26/06/18	08/08/18	A.OB	1	8	ESTIU	LARVA	0	Hisop	-
26/06/18	08/08/18	A.OB	1	9	ESTIU	LARVA	0	Hisop	-
26/06/18	08/08/18	A.OB	1	10	ESTIU	METAM.	0	Hisop	-
26/06/18	08/08/18	A.OB	1	11	ESTIU	METAM.	0	Hisop	+

Taula 11: Taula-resum de la segona fase d'anàlisi (8-8-2018), que ha servit per obtenir la prevalença de Bd en tòtil (*Alytes obstetricans*) a la localitat "Celrà". En verd = Individus, no infectats per Bd (-). En vermell, individus infectats per Bd (+).

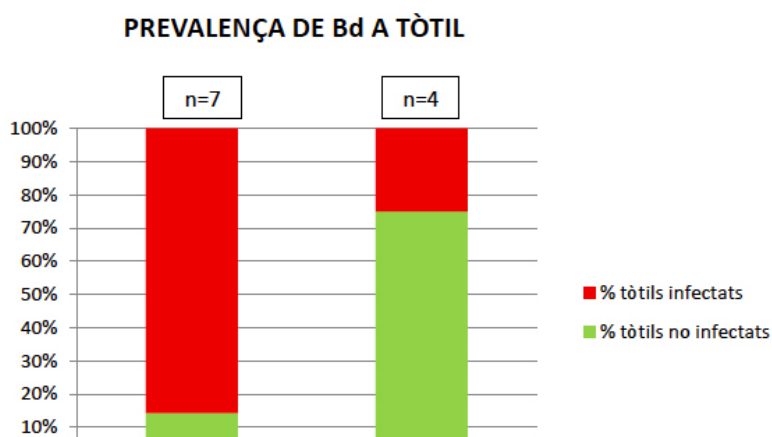


Figura 32: Prevalença de Bd a tòtil (*Alytes obstetricans*) a la localitat Celrà i segons l'estació de l'any en què s'han agafat les mostres. En verd, % individus, no infectats per Bd. En vermell, % individus infectats per Bd.

6.7.2. *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal)

No s'ha pogut calcular la prevalença (% d'individus infectats) per aquest patògen, ja que tots els anàlisis han sortit negatius, per tant no s'han detectat individus infectats.

6.7.3. Ranavirus

No s'ha pogut calcular la prevalença (% d'individus infectats) per aquest patògen, ja que tots els anàlisis han sortit negatius, per tant no s'han detectat individus infectats.

6.7.4. Altres patògens: dermocistidis

Pel que fa a aquest nou patògen força desconegut i poc estudiat, s'ha calculat la prevalença en individus de tritó palmat (*Lissotriton helveticus*) a la localitat "Can Puig", obtenint una prevalença gens menyspreable del 75% d'individus infectats (n=8) al hivern (figura 33).

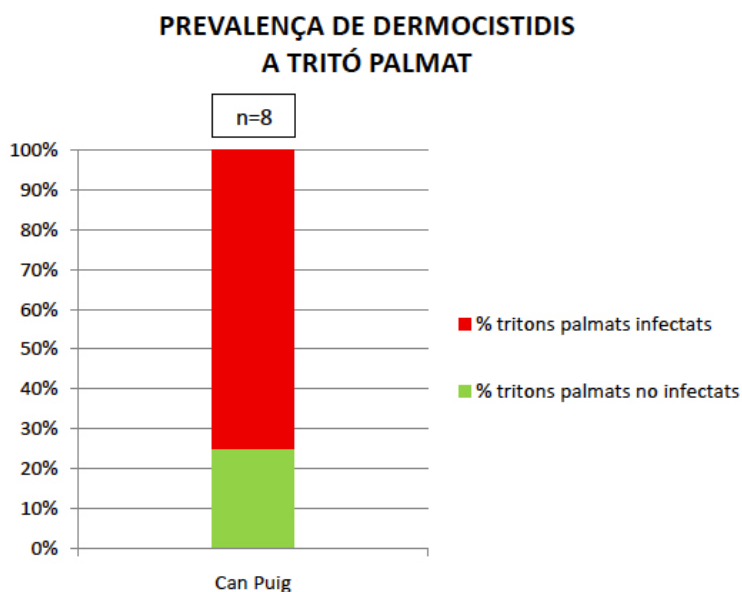


Figura 33: Prevalença de dermocistidi en tritó palmat (*Lissotriton helveticus*) a la localitat "Can Puig" durant l'hivern.

6.8. HÀBITATS ON S'HAN DETECTAT PATÒGENS

Pel que fa als tipus d'hàbitats on s'han detectat animals infectats, han sortit resultats positius a Bd tant a ambients lenítics com lòtics. El dermocistidi, en canvi, només s'ha detectat en ambients lenítics. També s'han detectat amfibis infectats per Bd a les 3 estacions de l'any (hivern, primavera i estiu) en què s'han agafat mostres (Taula 12).

ESPÈCIES	HÀBITAT	ESTACIÓ	N ₁	N ₂	PREVALENÇA (%)
Capçana					
Granota pintada (<i>Discoglossus pictus</i>)	Lenític	Primavera	2	2	100
Gripau corredor (<i>Epidalea calamita</i>)	Lenític	Primavera	0	2	0
Reineta (<i>Hyla meridionalis</i>)	Lenític	Primavera	1	1	100
Gripau d'esperons (<i>Pelobates cultripes</i>)	Lenític	Primavera	0	1	0
Gripauet de punts (<i>Pelodytes punctatus</i>)	Lenític	Primavera	0	1	0
Tritó verd (<i>Triturus marmoratus</i>)	Lenític	Primavera	1	6	16,7
Argilera					
Gripau corredor (<i>Epidalea calamita</i>)	Lenític	Primavera	1	1	100
Tritó verd (<i>Triturus marmoratus</i>)	Lenític	Primavera	1	1	100
Salamandra (<i>Salamandra salamandra</i>)	Lenític	Primavera	0	10	0
Celrè					
Tòtil (<i>Alytes obstetricans</i>)	Lòtic	Hivern	6	7	87,5
Tòtil (<i>Alytes obstetricans</i>)	Lòtic i terrestre	Estiu	1	4	25
Granota pintada (<i>Discoglossus pictus</i>)	Lòtic	Estiu	0	11	0
Gripau corredor (<i>Epidalea calamita</i>)	Lòtic	Primavera	0	18	0
Can Puig					
Tritó palmat (<i>Lissotriton helveticus</i>)	Lenític	Hivern	6	8	75
Granota verda (<i>Pelophylax perezi</i>)	Lenític	Hivern	0	1	0
Tritó verd (<i>Triturus marmoratus</i>)	Lenític	Hivern	0	15	0
Madremanya					
Granota pintada (<i>Discoglossus pictus</i>)	Lòtic	Hivern	1	1	100
Mas Salvador					
Granota pintada (<i>Discoglossus pictus</i>)	Lenític	Primavera	0	4	0
Rissec					
Gripau comú (<i>Bufo spinosus</i>)	Terrestre	Primavera	0	3	0
Daró					
Granota verda (<i>Pelophylax perezi</i>)	Lòtic	Primavera	0	1	0

Taula 12: Espècies analitzades, hàbitat de reproducció i estació de l'any en què s'ha agafat la mostra. Prevalença (% individus infectats) de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i dermocistidi per localitat. N1 = n° individus infectats. N2 = n° individus analitzats. Fons vermell = espècie infectada per Bd. Fons Taronja = espècie infectada per dermocistidi.

6.9. INCIDÈNCIA

El epidemiologia, incidència és el número de casos nous de la malaltia que s'està avaluant, que apareixen en un període de temps prèviament determinat. Es pot equiparar a una pel·lícula que reflexa el flux de l'estat de la malaltia.

S'ha detectat almenys un cas nou de mortalitat estretament lligada a la presència de Bd, concretament una granota pintada (*Discoglossus pictus*) trobada morta a la localitat "Madremanya" (figura 34). Aquest individu ha donat positiu en un primer anàlisi a la PCR qualitativa (presència/absència de Bd) realitzada pel laboratori alemany LABOKLIN, però això no confirmava que Bd hagués tingut a veure amb la mort de l'animal.



Figura 34: Granota pintada (*Discoglossus pictus*) trobada morta a la localitat "Madremanya", positiva a Bd.

Més tard s'han fet anàlisis histològics tant al laboratori del C.R.A.R.C. com al d'histopatologia de la UAB, podent observar al microscopi i fotografiar gran quantitat d'espors de Bd a la pell de l'amfibi (figura 35), la qual cosa ha fet sospitar que la causa de mort de l'animal estava estretament lligada a la presència de Bd. A més, per acabar de confirmar la causa de la mort també s'ha analitzat l'animal al laboratori del MNCN-CSIC de Madrid fent una PCR, aquesta vegada quantitativa, per tal de saber la càrrega de zoòspores, la qual ha sortit mitjana-alta (1074 equivalents genòmics de zoòspores en un sol dit) (Martínez-Silvestre, com. pers.). Per tant es pot afirmar amb tota probabilitat que la infecció per quitridi (Bd) ha tingut molt a veure amb la mort de la granota pintada en qüestió (figura 34).

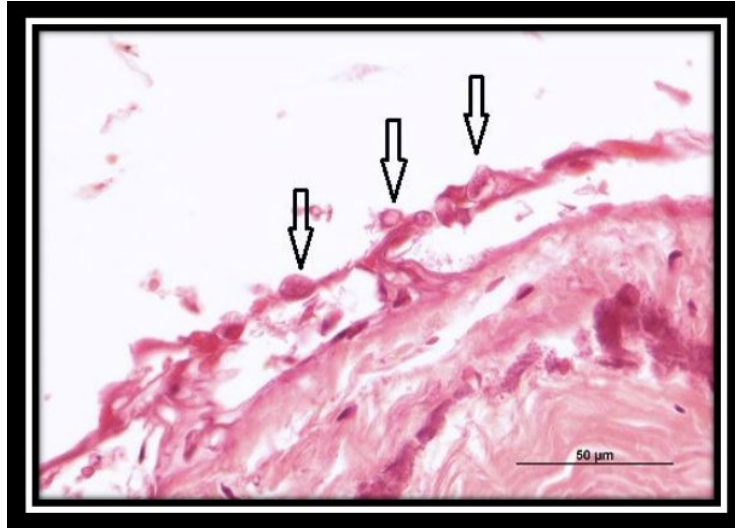


Figura 35: Fotografia de l'estudi histològic realitzada amb microscopi òptic a la U.A.B., on es veuen esporangis de Bd assenyalats amb fletxes a la pell de la granota pintada (*Discoglossus pictus*) trobada morta a la localitat "Madremanya".

No s'ha trobat incidència de cap dels altres 3 patògens analitzats (Bsal, Ranavirus i dermocistidi), ja que no s'ha detectat cap individu moribund o mort a causa d'aquests 3 patògens estudiats.

Pel que fa a Bd, gran part dels casos positius (on s'ha trobat ADN del patogen) detectats mitjançant la PCR qualitativa al laboratori es poden considerar infeccions subclíniques o asimptomàtiques. Per tant, exceptuant la granota pintada mencionada anteriorment que amb tota probabilitat ha mort a causa de la quitridiomicosi, els amfibis que han donat positiu per aquest patogen es poden considerar animals portadors asimptomàtics del fong. Aquests individus infectats no es poden considerar com a animals malalts, només portadors, per tant la incidència és gairebé nul·la al massís de les Gavarres, ja que de moment només s'ha trobat un cas de mort. Durant l'estudi s'ha localitzat una altra granota pintada morta a la localitat "Capçana" que ha donat positiu en Bd a la PCR qualitativa. També se li ha practicat una PCR quantitativa al MNCH-CSIC i ha sortit amb càrrega mitjana-alta (892 zoòspores en un sol dit), però a la histologia no s'han trobat estructures del fong, probablement perquè es trobava en un estat més avançat de descomposició (Martínez-Silvestre, com. pers.). Aquest animal està encara en fase d'anàlisi per tal de corroborar la causa de la mort.

Pel que fa a Bsal i Ranavirus, no s'han detectat nous casos de malaltia, ni tan sols s'han detectat animals asimptomàtics portadors d'aquests patògens, per tant la incidència de Bsal i Ranavirus al Massís de les Gavarres és nul·la, fins el moment.

Pel que fa als presumptes dermocistidis, s'han detectat símptomes (vesícules) a 6 dels 8 tritons palmats (*Lissotriton helveticus*) detectats a la bassa de "Can Puig" de Fitor, i a 1 dels 6 tritons verds (*Triturus marmoratus*) detectats a la bassa de la "Capçana" (taula 12). Als tritons palmats se'ls va alliberar un cop presa la mostra, però el tritó verd s'ha portat al laboratori del C.R.A.R.C.. S'ha donat la casuística que ha trigat 6 dies en arribar, i en aquests 6 dies els símptomes han desaparegut i el tritó no ha mort. Per tant, també es pot considerar un individu portador del patogen però no es pot considerar un cas nou de malaltia. Llavors es pot afirmar

que no s'ha trobat incidència en aquest individu, però com els altres individus infectats s'han alliberat en acabar el mostreig no se sap amb certesa si han mort o no. Es pot concloure, doncs, que no s'ha detectat incidència causada pel dermocistidi fins el moment.

6.10. MAPES DE DISTRIBUCIÓ DELS PATÒGENS

S'han escollit 7 punts de mostreig (figura 8) representatius, repartits per tot el Massís, per a realitzar les captures, obtenir les mostres i posteriorment poder fer els corresponents anàlisis de laboratori. A aquests 7 punts s'ha afegit una altra localitat, Madremanya, on el cos d'Agents Rurals ha detectat una granota pintada morta.

Amb els resultats dels anàlisis s'han elaborat 4 mapes de distribució, un per a Bd (figura 36), un per a Bsal (figura 37), l'altre per a Ranavirus (figura 38) i l'últim per al dermocistidi (figura 39). Aquests mapes son interactius i es poden consultar i modificar, si s'està acreditat, buscant el següent enllaç amb el navegador d'Internet:

<https://www.google.com/maps/d/edit?mid=1DoD3sC4VEIL9wKgv5NmT04fUkEjpbZD&ll=41.94006734251509%2C2.891265770614609&z=11>

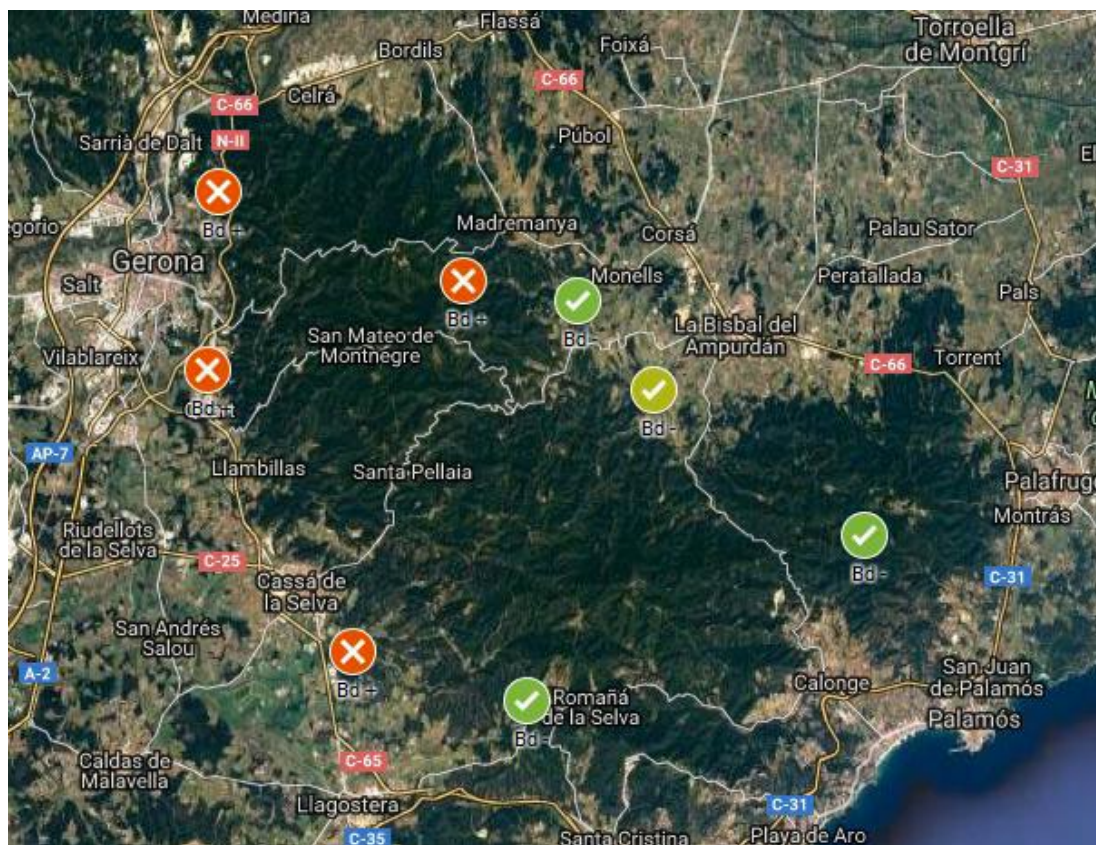


Figura 36: Mapa de distribució de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) al Massís de les Gavarres. En verd, localitats aparentment lliures de Bd. En vermell, localitats on s'ha detectat Bd al llarg de l'any 2018.

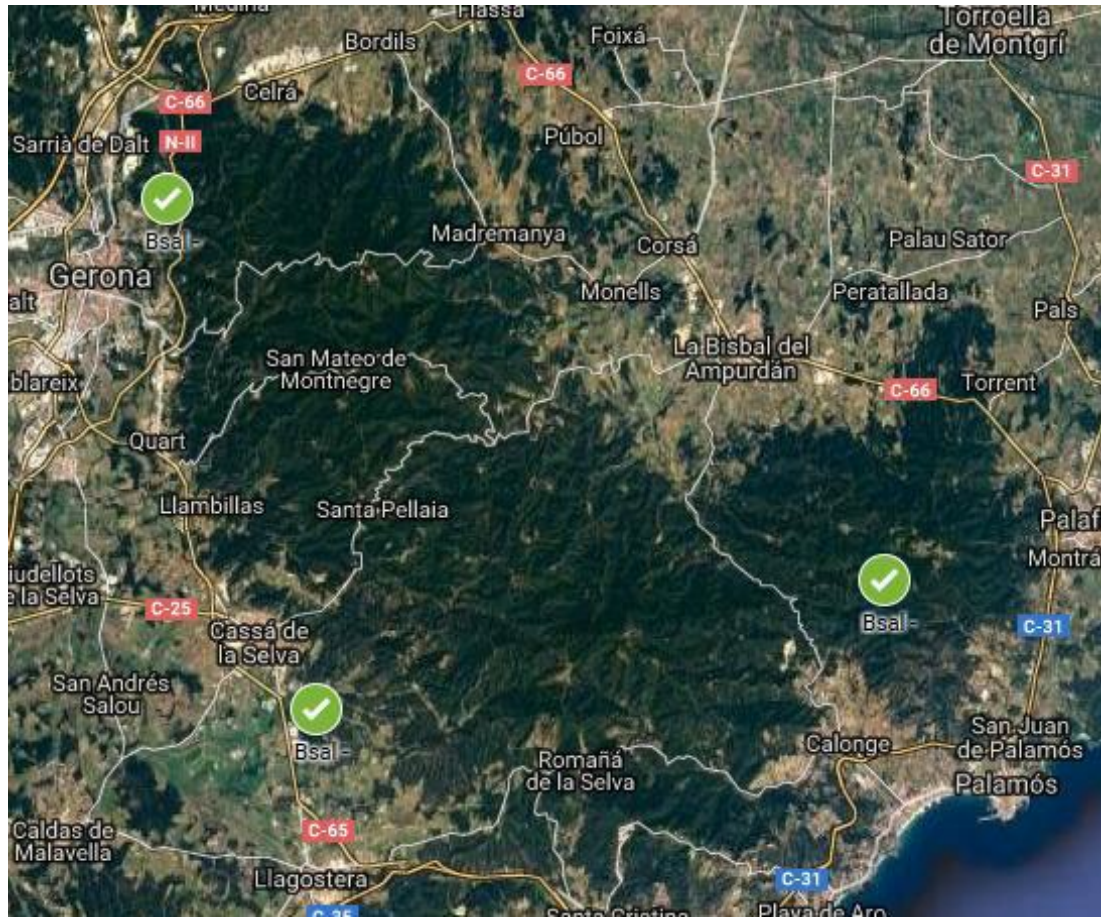


Figura 37: Mapa de distribució de *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) al Massís de les Gavarres. En verd, localitats aparentment lliures de Bsal.

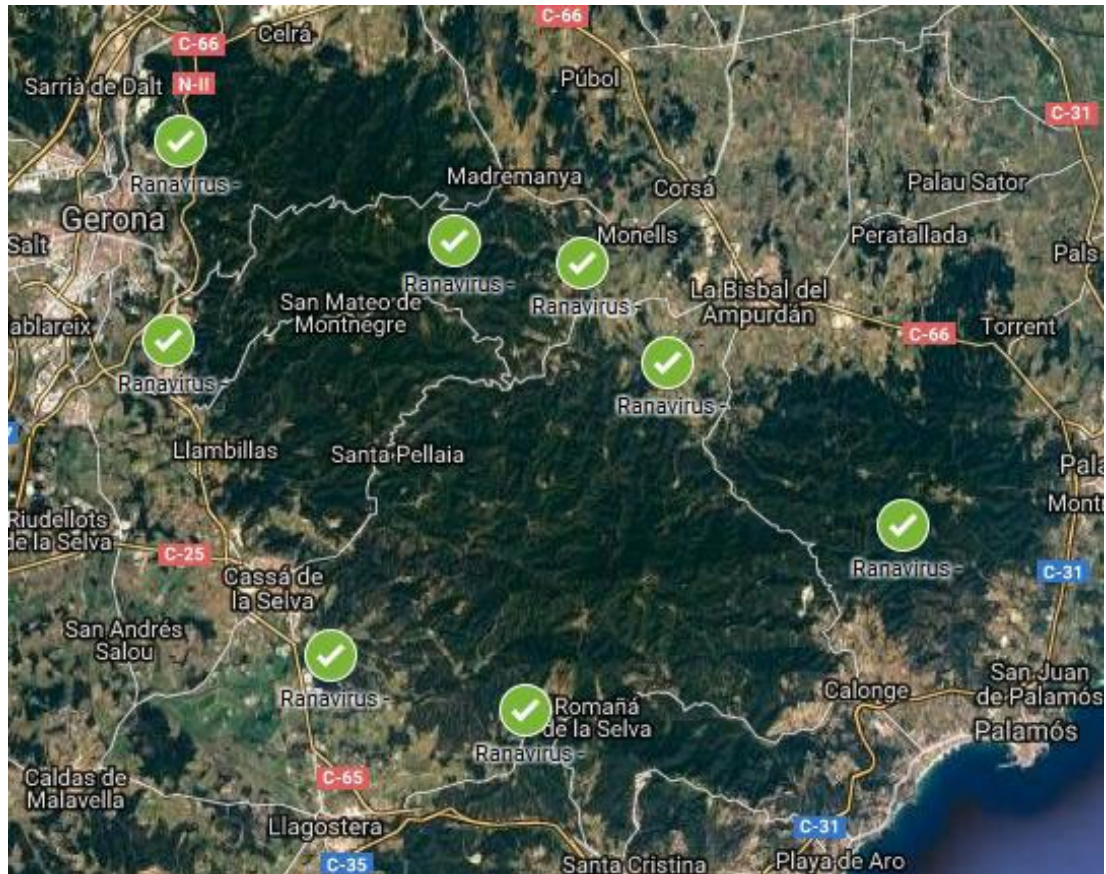


Figura 38: Mapa de distribució de Ranavirus al Massís de les Gavarres. En verd, localitats aparentment lliures de Ranavirus.

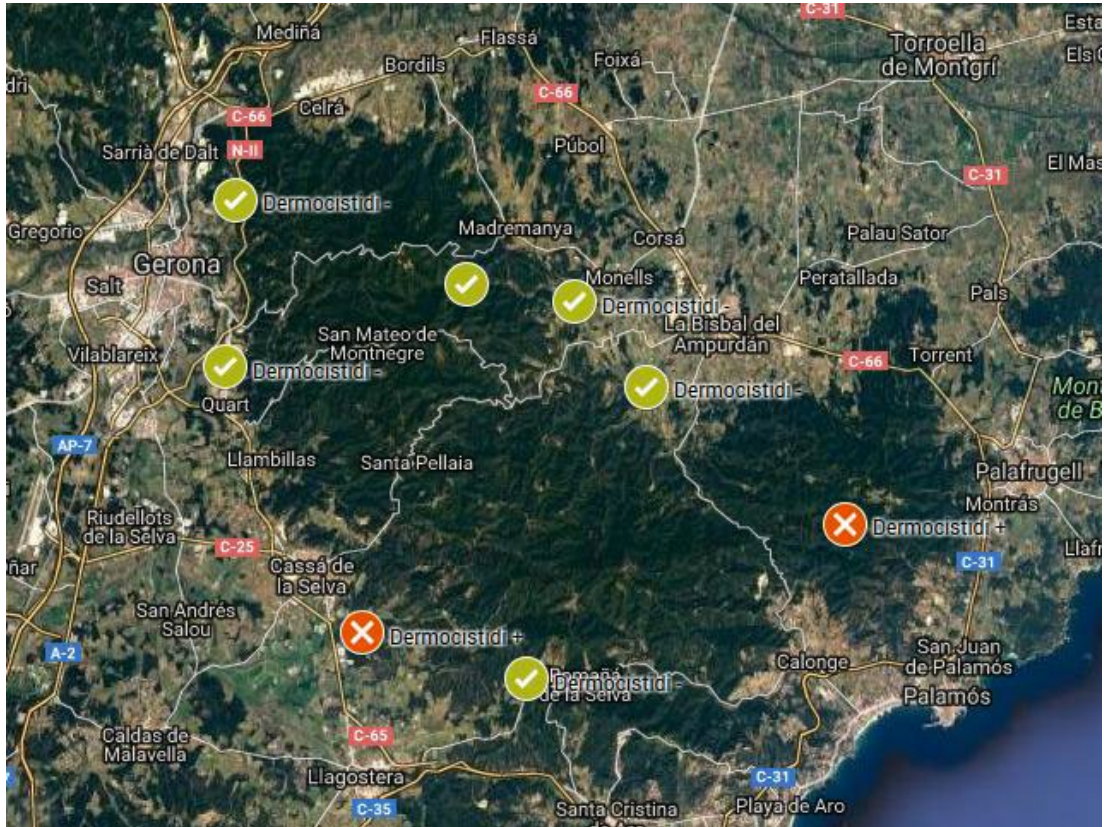


Figura 39: Mapa de distribució de dermocistidi al Massís de les Gavarres. En verd, localitats aparentment lliures de dermocistidi. En vermell, localitats on s'ha detectat dermocistidi.

7. MESURES DE PREVENCIÓ

Donats els resultats obtinguts en aquest estudi, és molt recomanable:

- Que tota persona que freqüenti el medi aquàtic i estigui en contacte amb alguna massa d'aigua o animal aquàtic segueixi estrictament el **protocol de bioseguretat** esmentat (veure apartat 3; METODOLOGIA) a tot el Massís de les Gavarres per tal de no actuar com a vectors de les malalties emergents detectades i, sobretot, de les que estan per arribar, potencialment més mortíferes a cotes baixes.
- Donar a conèixer la problemàtica de les malalties emergents d'amfibis mitjançant **programes d'educació ambiental** en escoles, centres excursionistes, societats de caçadors i altres col·lectius de persones que freqüenten les masses d'aigua de les Gavarres, ja que no només els tècnics que treballen al Massís poden ser els transmissors dels patògens.
- Redactar un programa de **seguiment de malalties emergents d'amfibis** a les Gavarres, prioritzant la vigilància dels punt d'aigua que han sortit positius a algun patogen, en especial els que han sortit positius a dermocistidis (Can Puig i Capçana) i els que s'han detectat individus morts per Bd (Madremanya), per tal de poder avaluar la repercussió de les malalties detectades al llarg dels anys i disposar d'informació continuada que permeti gestionar l'accés als punts d'aigua afectats.
- Crear una **xarxa de detecció ràpida de casos anòmals de mortalitat d'amfibis** al Massís de les Gavarres. Aquesta xarxa, que pot reunir-se anualment, si es creu oportú, pot estar formada en una primera instància pels tècnics del Consorci de les Gavarres, tècnics de medi ambient dels Ajuntaments de cada municipi inclòs dins el Consorci, representants del cos d'agents rurals de les demarcacions del Gironès i el Baix Empordà, tècnics d'entitats que treballin a l'EIN Gavarres i l'autor del projecte.

8. CONCLUSIONS

Aquest estudi ha permès disposar d'un **major coneixement sobre les malalties emergents a la comunitat d'amfibis del Massís de les Gavarres**. S'ha conegut a quines espècies d'amfibis està present Bd, la seva prevalença en el tòtil (*Alytes obstetricans*) en diferents estacions de l'any i la incidència de la quitridiomicosi al Massís.

Gràcies al recolzament d'aquest estudi per part del Consorci de les Gavarres, L'EIN "Massís de les Gavarres" s'ha convertit en **un dels pocs Espais d'Interès Natural de Catalunya on s'han estudiat les malalties emergents d'amfibis com a objectiu central** d'un projecte. Per tant, aquest organisme es pot considerar capdavanter pel que fa a l'estudi epidemiològic d'amfibis, en un context de declivi global d'aquests vertebrats a tot el món i també a Catalunya.

El factor limitant per portar a terme aquests tipus d'estudis és el factor econòmic, ja que els anàlisis de laboratori són molt costosos. El fet d'haver enviat **mostres agrupades** al laboratori LABOKLIN ha reduït els costos de l'estudi i **ha permès analitzar més individus**. Gràcies a aquesta metodologia s'han pogut fer un estudi preliminar sobre malalties emergents d'amfibis a les Gavarres, analitzar les 11 espècies del Massís i saber les espècies afectades pels patògens estudiats. Tot i això, si es vol fer un estudi més acurat, és a dir, calcular prevalences de totes les espècies per tenir valors de referència i també calcular càrregues d'infecció de totes les mostres per saber la quantitat d'infecció de cada individu, aquesta tècnica no és vàlida, ja que es barregen continguts de les mostres.

S'ha comprovat mitjançant tècniques moleculars de detecció de DNA (PCR qualitativa o *nested* PCR) la **presència de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd)** a la comunitat d'amfibis del **Massís de les Gavarres**, concretament a 4 de les 8 localitats que s'han estudiat, i a 5 de les 11 espècies d'amfibis analitzades.

També s'ha comprovat l'**absència de *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) i Rana-virus** a les 41 i 98 mostres analitzades respectivament per a cada patògen. Tot i aquesta afirmació, no es pot descartar la possibilitat de que aquests patògens ja s'hagin instal·lat al Massís en un punt no estudiat o s'hi instal·lin aviat, degut a la alta capacitat de dispersió que tenen aquests microorganismes.

A més, també s'ha detectat la **presència** d'unes **vesícules** sospitoses en tritó palmat (*Lissotriton helveticus*) i tritó verd (*Triturus marmoratus*) a 2 localitats. Aquests símptomes han estat provocats presumptament per un microorganisme del regne dels protists, un **dermocistidi paràsit d'amfibis** al qual no se li ha pogut assignar cap espècie en concret. S'han recollit proves fotogràfiques i morfològiques d'aquest patògen però no s'ha pogut demostrar clínicament de quina espècie es tracta, ja que per a saber l'espècie s'ha d'agafar una mostra de teixit de la mateixa vesícula de l'animal i s'ha de cultivar, *in vitro*, en una placa de petri amb un medi nutritiu adequat pel patògen. Aquest procés no ha estat possible en aquest estudi, però podria ser un nou tema a estudiar en futures investigacions.

S'ha detectat **Bd** en individus que estaven **en medi aquàtic** i d'altres que estaven **en medi terrestre**. Per tant, s'han de tenir presents en futurs estudis als animals detectats en medi te-

restre, els quals poden estar infectats, tal i com s'ha demostrat en aquest estudi on ha sortit positiu un metamòrfic de tòtil trobat sota una pedra a la localitat "Celrà". Pel que fa als tipus d'hàbitats aquàtics on s'han detectat presència d'animals infectats, han sortit resultats **positius a Bd** tant a **ambients lenítics** com **lòtics**. Per tant, cap dels dos hàbitats aquàtics s'haurien de discriminar alhora de fer futurs estudis sobre malalties emergents d'amfibis a Les Gavarres.

El **dermocistidi** només s'ha detectat en **ambients lenítics** i només en **urodels**. Això ens suggereix que els amfibis que es troben en basses podrien ser més propensos a desenvolupar aquests paràsits que els animals que viuen a rius i rieres, tot i que s'haurien de tenir dades de més punts de mostreig per a corroborar-ho.

S'han detectat **amfibis infectats per Bd a les 3 estacions de l'any** (hivern primavera i estiu) en què s'han agafat mostres. Es conclou, per tant, que aquestes 3 estacions són aptes per a fer estudis sobre Bd a les Gavarres.

Gairebé tots els **animals infectats** amb **Bd** que s'han detectat són **portadors asimptomàtics**. Això pot ser degut a **varis factors**:

- **La temperatura alta** (= o > 26°C en algun moment del dia) que es troba el fong quan les larves d'amfibis infectades fan la metamorfosi, normalment a finals de primavera o principis d'estiu, no és apta per a la supervivència i creixement del fong dins la dermis dels animals i probablement degut a això no s'han detectat episodis de mortalitats massives d'amfibis.
- També, el **baix número de dies amb temperatures baixes** a l'àrea d'estudi pot ser un factor determinant per a l'absència de mortalitats massives d'amfibis a les Gavarres. Les temperatures baixes continuades immunodeprimeixen als amfibis, amb la qual cosa Bd actua com a patògen oportunista i pot ser causa de mortalitats massives. Aquestes condicions climatològiques no acostumen a donar-se al Massís de les Gavarres, on hi ha un clima mediterrani amb temperatures suaus, però sí permet al fong passar l'hivern a la pell dels amfibis, per tant aquests animals es converteixen en portadors asimptomàtics.
- La **susceptibilitat de cada espècie** a contraure quitridiomicosi també pot ser determinant, ja que hi ha espècies capaces de sobreviure amb el fong creixent a la seva pell (actuen com a vectors) i d'altres que no sobreviuen tan fàcilment. Segons Brannelly et al. (2017), els amfibis que no estan en declivi poden ser bons hostes reservoris per a Bd, fet que es podria estar donant a les Gavarres amb la granota pintada (*Discoglossus pictus*), espècie en expansió, amb forces casos positius a Bd i amb càrregues altes d'infecció però amb baixa susceptibilitat, per tant un perfecte vector del patògen.
- S'han descrit varies **soques de Bd** arreu del món, algunes **més virulentes que d'altres**. En aquest estudi no s'ha analitzat la soca o soques detectades en amfibis de les Gavarres, però podria ser un altre factor a tenir en compte per a futurs estudis.

El fet que la **prevalença** de Bd calculada en tòtil (*Alytes obstetricans*) a la localitat "Celrà" sigui més alta a l'hivern que a l'estiu (figura 32) pot ser degut a varis factors. Un d'ells pot ser que la Tª de l'aigua a l'estiu ha augmentat fins a uns nivells que el fong no pot tolerar (>26°C), per això en aquesta època de l'any s'han detectat menys individus infectats. Tot i això, el número d'individus analitzats per al càlcul de la prevalença és baix (n=7 a l'hivern i n=4 a l'estiu), per a obtenir resultats estadístics robustos. En estudis posteriors es recomana agafar mostres d'almenys 20 individus per comprovar si la tendència del % d'individus infectats és la mateixa o canvia.

Es pot concloure que la **quitridiomicosi causada per Bd** té una **incidència molt baixa** al Massís de les Gavarres, ja que no s'han trobat mortalitats massives d'amfibis. Només s'ha detectat, fins el moment, **un cas de mortalitat associada a Bd al Massís de les Gavarres**: una granota pintada trobada morta a la localitat "Madremanya", concretament al riu Rissec. Tot i això, aquesta troballa és de gran importància per a la ciència, ja que segons la bibliografia i investigadors experts en epidemiologia d'amfibis es pot afirmar que aquest és el **primer cas descrit de mortalitat estretament lligada a la presència de Bd en granota pintada (*Discoglossus pictus*) a Catalunya i al món**, recolzada per anàlisis moleculars a dos laboratoris diferents (LABOKLIN i MNCN-CSIC) i anàlisis histològics a dos centres especialitzats (C.R.A.R.C. i servei d'histopatologia de la U.A.B.) que corroboren les altes càrregues de zoòspores a la pell d'aquest individu. Gràcies a aquest anàlisi múltiple on han participat diversos investigadors de renom s'ha pogut corroborar que hi ha incidència de la quitridiomicosi al Massís de les Gavarres. És, per tant, una troballa inèdita i excepcional, pendent de publicar a una revista científica indexada.

Pel que fa a les **malalties generades pels altres 3 patògens estudiats (Bsal, Ranavirus i dermocistidi)**, la **incidència és nul·la** fins el moment al Massís de les Gavarres, ja que no s'han detectat casos nous de mortalitat associada a aquests microorganismes. Tot i això cal afegir que, com a bons patògens, estan esperant a ser transportats i a que canviïn les condicions de salut dels seus hostes per causar mortalitats. Per tant, cal un estat d'alerta per part de l'administració competent i els tècnics de l'EIN encara que la incidència actualment sigui nul·la.

No s'ha pogut corroborar la presència de Bd ni Ranavirus a les 17 mostres de cranc vermell americà (*Procambarus clarkii*) analitzades en mostra agrupada. Si els anàlisis haguessin sortit positius voldria dir que s'han trobat zoòspores de Bd, però aquest fet és irrellevant, ja que les zoòspores son de vida lliure i, per tant, poden estar a qualsevol lloc. Per exemple, s'han detectat zoòspores de Bd a pedres o a la pell de rèptils (J. Bosch, com. pers.). El que és rellevant és que Bd pugui créixer al tracte digestiu dels crancs, com està ja descrit a la bibliografia (Brannelly, L.A. *et al.*, 2015), i per això cal fer histologia del tracte digestiu dels crancs, agafar una mostra amb hisop estèril del tracte digestiu, analitzar la mostra al laboratori mitjançant PCR i contrastar la informació. Si es veuen estructures vives del fong i l'anàlisi de PCR surt positiu vol dir que aquell cranc està actuant com a reservori de Bd, però aquests anàlisis s'han emplaçat a estudis posteriors.

El treball en xarxa ha estat imprescindible per a la detecció d'amfibis morts en aquest estudi. Sense la col·laboració del Cos d'Agents Rurals, la mostra de Madremanya no s'hagués obtingut i, per tant, s'hauria disposat de menys informació. A més, l'estudi ha servit perquè a partir d'ara aquest organisme estigui alerta si succeeix un episodi d'infecció en el futur i sobre-

tot per poder actuar en conseqüència de manera ràpida i eficient.

El fet d'haver generat un **mapa editable de distribució dels 4 patògens estudiats** permetrà tenir constància dels casos d'infecció detectats fins ara i pot esdevenir una eina de bolcat de dades i de consulta per a futures investigacions d'aquests patògens al Massís de les Gavarres.

Algunes de les localitats més freqüentades per persones (Argilera, Celrà i Capçana) i han coincidit amb casos positius de Bd, però també ha hagut un cas positiu de Bd a una localitat aparentment poc freqüentada (Madremanya). El mateix ha passat amb el dermocistidi: a la localitat Capçana, força freqüentada, ha aparegut un cas d'aquest paràsit, i a una localitat poc freqüentada (Can Puig) també s'ha detectat aquest paràsit. Aquesta casuística fa pensar que, contràriament al que es podia preveure, no només a les àrees molt freqüentades per persones es localitzen patògens d'amfibis.

Gran part dels individus infectats per Bd han resultat ser, a priori, portadors asimptomàtics. Aquesta troballa planteja **dues hipòtesis per a futurs estudis**:

- Són més vulnerables els amfibis portadors asimptomàtics de Bd a altres causes de mort com, per exemple, la depredació?
- El fong, tot i no acabar amb la vida de l'animal, provoca disfuncions suficients en l'hoste com per fer-lo més vulnerable?

Segons Gründler, M.C. *et al.*, (2012), a cotes baixes, l'**elecció de l'hàbitat de l'amfibi hoste és un important factor determinant de la infecció per Bd**. Aquesta afirmació obre la porta a estudis etològics de selecció d'hàbitat d'individus infectats pel fong.

9. AGRAÏMENTS

En nom de la Societat Catalana d'Herpetologia voldria agrair a tota persona que ha participat en el present projecte. Primer de tot dir que sense el finançament i la col·laboració dels tècnics del Consorci de les Gavarres no hauria estat possible aquest treball, gràcies. També agrair al Cos d'Agents Rurals del Gironès i del Baix Empordà la seva participació activa en el projecte, ajudant en la cerca i recol·lecció d'amfibis morts. Al veterinari i professor de la UdG, Oriol Vidal, per proporcionar-me material de laboratori per a agafar les mostres dels patògens de l'estudi. Al veterinari del C.R.A.R.C., Albert Martínez-Silvestre, per fer les histologies/necròpsies dels animals morts i per tenir una comunicació fluida amb l'autor a l'hora d'enviar i rebre els resultats dels anàlisis fets pel laboratori alemany LABOKLIN. Al laboratori mencionat per fer els anàlisis. També agrair a Roser Velarde, investigadora del servei d'histopatologia de la UAB, per ajudar en la diagnosi de la histologia realitzada als animals morts i aportar fotografies de Bd fetes al microscopi. Per últim, agrair a Jaime Bosch, investigador del MNCN – CSIC i descobridor de la quitridiomicosi, per la seva disponibilitat i atenció a l'hora de resoldre'ns dubtes i per l'acceptació d'analitzar amb PCR quantitativa les mostres dels animals morts al laboratori del CSIC per tal de saber la càrrega d'espores del fong. A tots, moltes gràcies.

10. BIBLIOGRAFIA

- Bargalló, F., Martínez-Silvestre, A. & Fernandez-Guiberteau, D. (2016). Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios asintomáticos en Cataluña. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*. 27(2): 88-91.
- Berger, L., Spearea R., Daszard, P., Greene, D.E., Cunningham, A., Louise Gogging, C., Slocombe, R., Ragani, 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.
- Blaustein, A.R., Romansic, J.M., Schesseele, E.A., Han, B.A., Pessier, A.P. & Longcore, J.E. 2005. Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology*, 19: 460-68.
- Boix, D., Gascón, S., Martinoy, M., Montserrat, E. & Sala, J., (2005). *Fauna aquàtica de les Gavarres*. Biblioteca Lluís Esteva, Monells, Espanya. 152 pp.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I., García-París, M. (2001). Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*. 97:331-337.
- Bosch, J. & Martínez-Solano, I. (2006). Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park (Central Spain). *Oryx*, 40: 84-89.
- Bosch, J., & García-Alonso, D. (2012). Capítulo 9: Susceptibilidad a la quitridiomycosis. 63-67. In: Bosch, J. & González-Miras, E. (Editores). 2012. *Seguimiento de Alytes dickhilleni: Informe final*. Monografías SARE. Asociación Herpetológica Española – Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid.
- Bosch, J., Sanchez-Tomé, E., Fernández-Loras, A., Oliver, J.A., Fisher, M.C., Garner, T.W.J., 2015. Successful elimination of a lethal wildlife infectious disease in nature. *Biol. Lett.*, 11: 20150874.
- Bovero, S., Sotgiu, G., Angelini, C., Doglio, S., Gazzaniga, E., Cunningham, A.A., & Garner, T.W.J., (2008). Detection of chytridiomycosis caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the endangered sardinian newt (*Euproctus platycephalus*) in Southern Sardinia, Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 44 (3): 712-715.
- Brannelly, L.A., McMahon, T.A., Hinton, M., Lenger, D., Richards-Zawacki, C.L. (2015) *Batrachochytrium dendrobatidis* in natural and farmed Louisiana crayfish populations: prevalence and implications. *Dis. Aquat. Org.* 112: 229-235.
- Brannelly, L.A., Webb, R.J., Hunter, D.A., Clemann, N., Howard, K., Skerratt, L. F., Berger, L. & Scheele, B. C., (2017). Non-declining amphibians can be important reservoir hosts for amphibian chytrid fungus. *Animal conservation*, 21: 91-101.
- Cunningham, A.A.; Beckmann, K.; Perkins, M.; Fitzpatrick, L.; Cromie, R.; Redbond, J.; O'Brien, M.F.; Priya Ghosh; Shelton, J.; Fisher, M.C., (2015). Emerging disease in UK amphibians. *Veterinary Record* 176(18): 468.

- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E. & Speare, R. (1999). Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases* 5, 735–748.
- Diego-Rasilla, F.J. (2017). Parasitic dermic cyst in *Mesotriton alpestris* (Caudata: Salamandridae). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 28(2): 56-57.
- Duffus A.L.J. & Cunningham A.A., (2010). Major disease threats to European amphibians. *Herpetological Journal*, 20: 17-27.
- Fernandez-Guiberteau, D., Bargalló, F., Martínez-Silvestre, A., Miras, M., Blanco, O. & Mompert, J.M., (2016). Projecte Grafi: aportacions al coneixement sobre biopatologia de les poblacions catalanes de granotes verdes. *Butlletí de la Societat Catalana d'Herpetologia*, 23: 39-43.
- Fisher, M.C., Garner, T.W.J. & Walker, S.F. (2009). The global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in space, time and host. *Annual Review of Microbiology*, 63: 291-310.
- Galán, P. & Dopereiro, D. (2017). Infección por dermocistidios (*Dermocystida*) en una población de *Lissotriton helveticus* de A Limia (Ourense, Galicia). *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 28(1): 16-20.
- Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Hyatt, A.D., Cunningham, A.A. & Fisher, M.C. (2005). Chytrid Fungus in Europe. *Emerging Infectious Disease*, 11: 1639-1641.
- Gascon, C., Collins, J.P., Moore, R.D., Church, D.R., McKay, J.E., & Mendelson, J.R. III (2007). Amphibian Conservation Action Plan. IUCN/SSC Amphibian Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- González-Hernández, M., Denoel, M., Duffus, A.L.J., Garner, T.W., Cunningham, A.A. & Acheson, K.A. (2010). Dermocystid infection and associated skin lesions in free-living palmate newts (*Lissotriton helveticus*) from Southern France. *Parasitology International*, 59: 344-350.
- Granoff, A. (1989) Viruses of Amphibia: an historical perspective. In *Viruses of Lower Vertebrates*, 3–12. Ahne, W. & Kurstak E. (eds). Berlin: Springer-Verlag.
- Gründler MC, Toledo LF, Parra-Olea G, et al. Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. *Diseases of aquatic organisms*, 97: 173–184.
- Hidalgo-Vila, J., Díaz-Paniagua, C., Marchand, M.A. & Cunningham, A.A., (2012). *Batrachochytrium dendrobatidis* infection of amphibians in the Doñana National Park, Spain. *Diseases of aquatic organisms*, 98: 113-119.
- Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Olsen, V., Boyle, D.B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F. & Collins, A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73: 175-192.
- 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.
- Lötters, S., Kielgast, J., Bielby, J., Schmidlein, S., Bosch, J., Veith, M., Walker, S.F., Fisher, M.C. & Rödder, D. (2010). The link between rapid enigmatic amphibian decline and the globally emerging chytrid fungus. *EcoHealth*, 6: 358-372.

Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2004) *100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database.*

Maluquer -Margalef, J.; Fernández-Guiberteau, D.; Miras, M.; Bargalló, F. & Rivera, X. (2017). El projecte de recuperació del tritó verd (*Triturus marmoratus*) a la Serralada Litoral (2010-2015). *III Trobada d'Estudiosos de la Serralada Litoral Central i VI del Montnegre i el Corredor, 19 i 20 de novembre de 2015. Diputació de Barcelona Sèrie Territori i Parcs Naturals, 2:* 226-235.

Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle R., Fisher M.C., Woeltjes A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F. & Pasmans, F., (2013). *Batrachochytrium salamandri-vorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110: 15325–15329.

Martel A; Blooi M; Adriaensen C; Rooij P van; Beukema W; Fisher MC; Farrer RA; Schmidt BR; Tobler U; Goka K; Lips KR; Muletz C; Zamudio KR; Bosch J; Lötters S; Wombwell E; Garner TWJ; Cunningham AA; Spitzen-van der Sluijs A; Salvidio S; Ducatelle R; Nishikawa K; Nguyen TT; Kolby JE; Bocxlaer I van, Bossuyt F (et al.), (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science* (Washington), 346(6209): 630-631.

Martínez-Silvestre A., Fernández-Guiberteau D., Pérez-Sorribes L. & Velarde R., (2017). Infección por dermocistidios en *Lissotriton helveticus* en Cataluña: nuevos datos y apuntes sobre su diagnóstico. *Boletín de la Asociación Herpetológica Española*, 28(2): 66-69.

McMahon T.A., & Rohr J.R. (2014). Transition of chytrid fungus infection from mouthparts to hind limbs during amphibian metamorphosis. *Ecohealth* 12(1).

Melero J.A., (2016). La quitridiomycosi. *Herpetofull de la Societat Catalana d'Herpetologia*, 11: 33-37.

Miras M., Fernandez-Guiberteau D., Garcia X., Bargalló, F. Espuny A., Baena O., García A. & Maluquer-Margalef, J. (2017). Noves aportacions en la distribució de *Batrachochytrium dendrobatidis* a Catalunya. *Butlletí de la Societat Catalana d'Herpetologia*, 24: 66-72.

Navarro-Lozano A, Sánchez-Domene D, Rossa-Feres DC, Bosch J, Sawaya RJ (2018) Are oral deformities in tadpoles accurate indicators of anuran chytridiomycosis? *PLoS ONE* 13(1): e0190955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190955>

Oliver J.A., Manzano X., Piña S., Bosch J., Walker S.F., Fisher M. & Rosa G.A. (2006). Presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en poblaciones silvestres de ferreret (*Alytes muletensis*) y sus implicaciones en la gestión de la especie. *I Congreso Técnico de Conservación de Fauna y Flora*. Conferencia llevada a cabo en Formentor, Mallorca.

Obón E., Carbonell F., Valbuena-Ureña E., Alonso M., Larios R., Fernández-Beaskoetxea S., Fisher M.C., & Bosch J. (2013). Chytridiomycosis surveillance in the critically endangered Montseny brook newt, *Calotriton arnoldi*, northeastern Spain. *Herpetological journal*, 23: 237-240.

O'Hanlon S.J., Rieux A., Farrer R.A., Rosa G.M., Waldman, . 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.S., Lin, C., Laurila, A., Loyau, A., Martel, A., Meurling, S., Miaud, C., Minting, P, Pasmans, F., Schmeller, D.S., 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., Trenton W. J. Garner, T.W.J., Fisher M.C., et al. (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science* 360, 621–627.

Ohst, T., Gräser, Y. & Plötner, J. (2013). *Batrachochytrium dendrobatidis* in Germany: distribution, prevalences, and prediction of high risk areas. *Diseases of aquatic organisms*, 107: 49-59.

Pereira, C.N., Di Rosa, I., Fagotti, A., Simoncelli, F., Pascolini, R. & Mendoza, L. 2005. The pathogen of frogs *Amphibocystidium ranae* is a member of the order dermocystidian in the class mesomycetozoa. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1): 192-8.

Rödger, D., Kielgast, J., Bielby, J., Schmidlein, S., Bosch, J., Garner, T.W.J., Veith, M., Walker, S.F., Fisher, M.C. & Lötters, S. (2009). Global amphibian extinction risk assessment for the panzootic chytrid fungus. *Diversity*, 1: 52-66.

Saura-Mas, S., Pifarré, M. & Pedernera, C. (2016). Diagnosi de la diversitat i distribució d'amfibis al Parc Natural dels Aiguamolls de l'Empordà. *Annals de l'Institut d'Estudis Empordanesos*, 47: 237-266.

Spitzen-van der Sluijs A, Spikmans F, Bosman W, De Zeeuw M, Van Der Meij T, Goverse E, Kik M, Pasmans F & Martel A (2013) Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia*, 34(2): 233-239.

Spitzen-Van Der Sluijs A; Martel A; Asselberghs J; Bales EK; Beukema W; Bletz MC; Dalbeck L; Fonte M da; Nöllert A; Ohlhoff D; Sabino-Pinto J; Schmidt BR; Speybroeck J; Spikmans F; Steinfartz S; Veith M; Vences M; Wagner N; Pasmans F, (2016). Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7): in press.

Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young B. E., Rodrigues, A. S. L., Fishman, D. L. & Waller, R. W., (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306: 1783-1786.

ANNEXOS

ANNEX A-I. MAPES

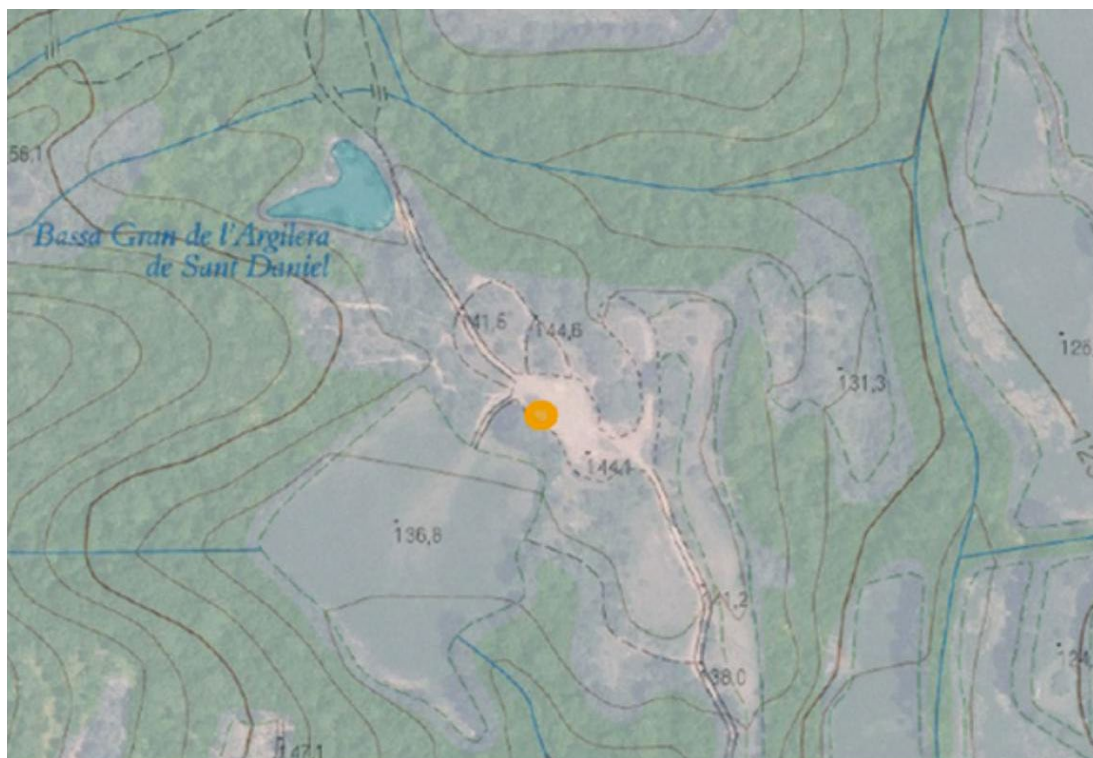


Figura A-I.1: Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 de la Bassa de l'argilera de Sant Daniel, localitat "Argilera" (punt taronja), Municipi de Girona. Coordenades UTM: 487098 X, 4649649 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC.



Figura A-I.2: Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 de la Riera de Celrà, localitat "Celrà" (punt taronja), Municipi de Quart. Coordenades UTM: 486743 X, 4644091 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC.

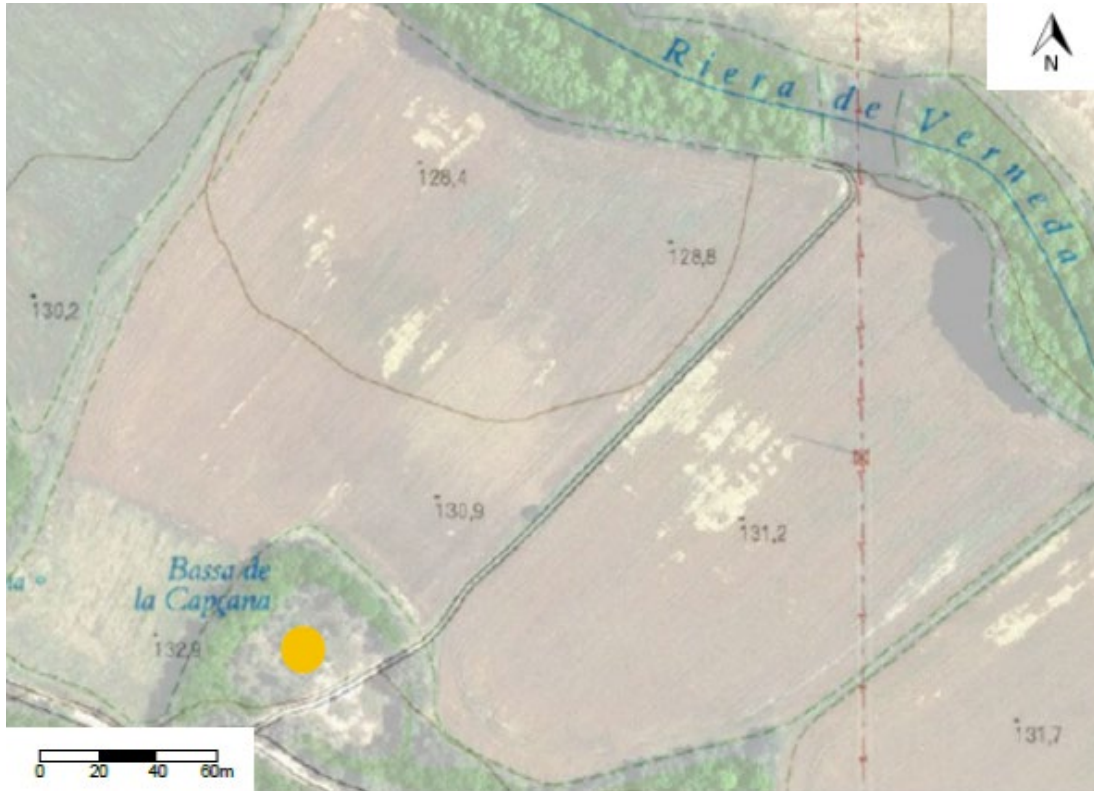


Figura A-I.3: Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 de la Bassa de la Capçana, localitat "Capçana" (punt taronja), municipi de Cassà de la Selva. Coordenades UTM: 491290 X, 4635315 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC.

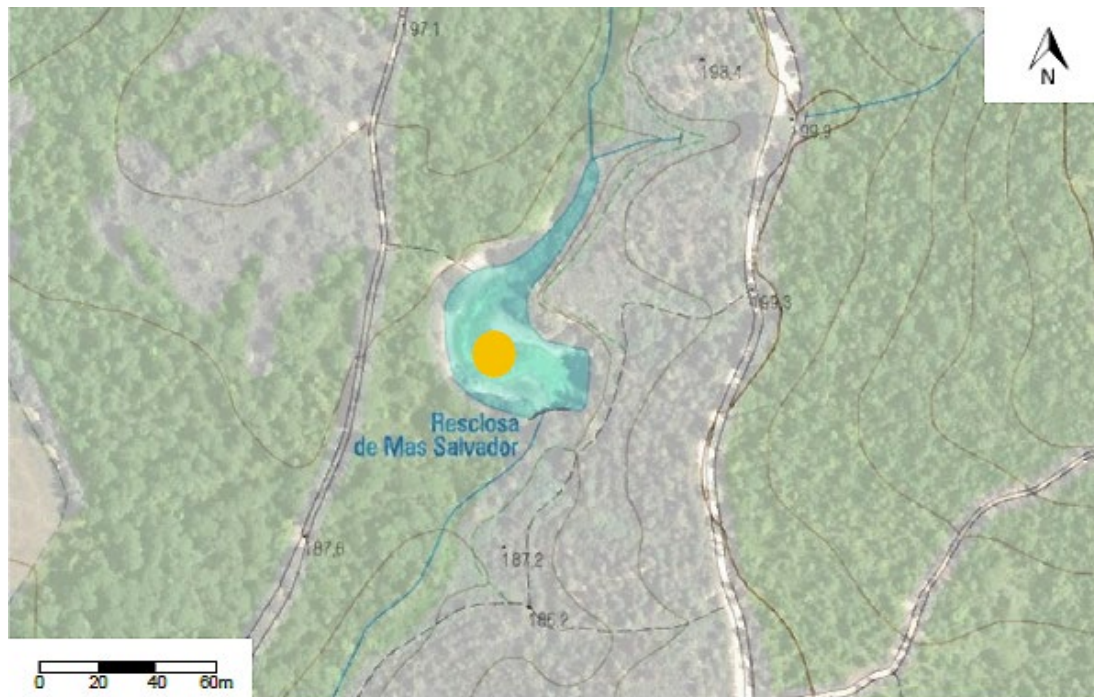


Figura A-I.4: Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 de la Resclosa de Mas Salvador, localitat "Mas Salvador" (punt taronja), municipi de Santa Cristina d'Aro. Coordenades UTM: 496767 X, 4633764 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC.



Figura A-I.5: Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 de la Bassa de Can Puig de Fitor, localitat “Can Puig” (punt taronja), municipi de Forallac. Coordenades UTM: 496767 X, 4633764 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l’ICGC.



Figura A-I.6: Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 del Riu Daró a la Palanca de Cruïlles, localitat “Daró” (punt taronja), municipi de Cruïlles, Monells i Sant Sadurn de l’Heura. Coordenades UTM: 500750 X, 4643458 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l’ICGC.



Figura A-I.7: Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 del Riu Rissac, prop de Monells localitat "Rissac" (punt taronja), municipi de Cruïlles, Monells i Sant Sadurní de l'Heura. Coordenades UTM: 498330 X, 4646303 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC.

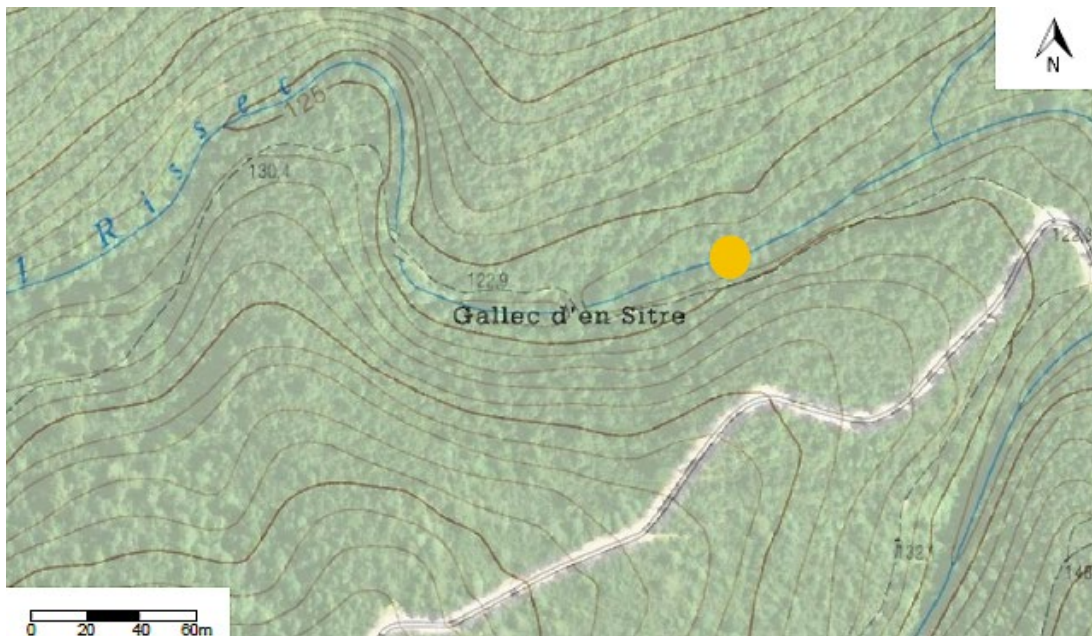


Figura A-I.8: Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 del Riu Rissac, prop de Mas Vidal localitat "Madremanya" (punt taronja), municipi de Madremanya. Coordenades UTM: 494726 X, 4646836 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC.

ANNEX A-II. FOTOGRAFIES



Figura A-II.1: Bassa de l'argilera de Sant Daniel, localitat "Argilera", Municipi de Girona.



Figura A-II.2: Bassa de Can Puig de Fitor, localitat "Can Puig". Municipi de Forallac.



Figura A-II.3: Bassa de la Capçana, localitat "Capçana". Municipi de Cassà de la Selva.



Figura A-II.4: Riera de Celrà, localitat "Celrà". Municipi de Quart.

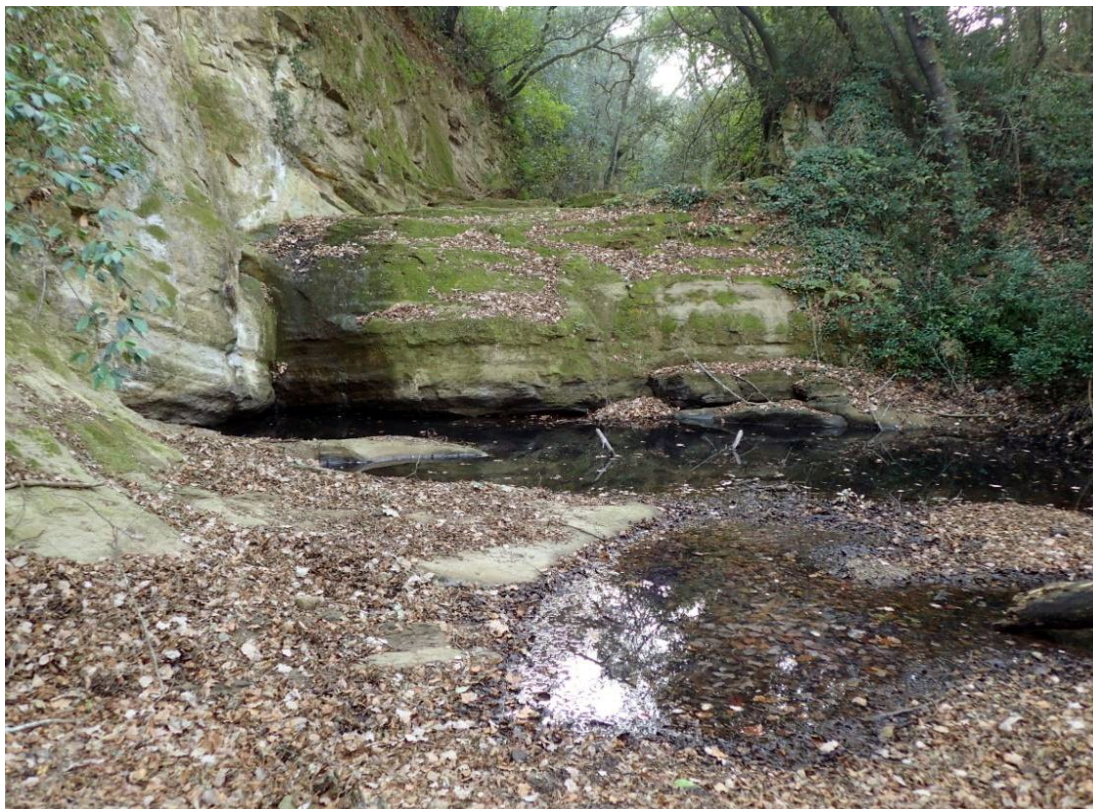


Figura A-II.5: Riu Risssec. Localitat "Risssec". Municipi de Monells.



Figura A-II.6: Resclosa de Mas Salvador, localitat "Mas Salvador". Municipi de Santa Cristina d'Aro.



Figura A-II.7: Petita gorga de la capçalera del Riu Rissec, localitat "Madremanya". Municipi de Madremanya. Fotografia cedida pel Cos d'Agents Rurals del Gironès.



Figura A-II.8: Granota pintada (*Discoglossus pictus*) detectada morta a la riba d'una bassa de la localitat "Capçana", la qual ha resultat ser positiva a Bd.

RELACIÓ DE FIGURES I TAULES

	pàg.
Figura 1.- Cicle biològic del fong <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd). Font: J.A. Melero, Herpetofull n° 11 de la Societat Catalana d'Herpetologia.	13
Figura 2.- Exemplar recent metamorfozat de tòtil (<i>Alytes obstetricans</i>) trobat mort a Canillas de Aceituno, Màlaga. Font: Bosch, J. Susceptibilidad a la quitridiomycosis. 2012.	14
Figura 3.- Mapa on es recullen els casos positius i negatius a Bd a Catalunya fins l'any 2017. Les quadrícules 10x10 Km. marcades en verd signifiquen resultats negatius de Bd. Les vermelles, blaves i violetes indiquen resultats positius a Bd en diferents estudis realitzats: Fernández-Guiberteau <i>et al.</i> 2016, Miras, M. <i>et al.</i> , 2017 i plataforma web "Bd maps".	15
Figura 4.- Protocol de bioseguretat oficial de la Generalitat de Catalunya.	20
Figura 5.- Fotografies de les diferents fases del protocol de desinfecció del material després d'un mostreig.	21
Figura 6.- Fotografies de les diferents fases d'un mostreig de malalties emergents d'amfibis.	24
Figura 7.- Fotografia del procés d'anàlisi histològic realitzat pel veterinari del C.R.A.R.C., Albert Martínez-Silvestre.	25
Figura 8.- Mapa de l'EIN Massís de les Gavarres on es marquen els punts de mostreig i recollida de mostres. En verd, els hàbitats lenítics. En blau, els hàbitats lòtics. Província de Girona. Font: Elaboració pròpia a partir de Google Earth.	27
Figura 9.- Fotografies de 10 de les 11 espècies capturades i analitzades al Massís de les Gavarres al llarg de l'estudi.	31
Figura 10.- Riquesa d'amfibis detectada a les diferents localitats de mostreig.	33
Figura 11.- Percentatge d'individus adults, metamòrfics i larves capturats.	34
Figura 12.- Percentatge d'individus analitzats i no analitzats a tota l'àrea d'estudi, tenint en compte totes les morfologies (adults, metamòrfics i larves).	35
Figura 13.- Percentatge d'individus adults, metamòrfics i larves analitzats.	35
Figura 14.- Percentatge d'individus analitzats i no analitzats segons la seva morfologia.	36
Figura 15.- Percentatge d'exemplars de cada espècie analitzats a tota l'àrea d'estudi.	38
Figura 16.- Número d'individus de les diferents espècies analitzats a cadascuna de les localitats de l'àrea d'estudi.	39
Figura 17.- Número d'espècies detectades i analitzades a les diferents localitats.	40

Figura 18.-	Percentatge d'espècies positives i negatives a Bd, tenint en compte les 11 espècies presents al Massís de les Gavarres. "Bd-" = <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) està absent. "Bd +" = <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) està present.	46
Figura 19.-	En vermell, percentatge d'individus de cada espècie infectats amb <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd+). En verd, percentatge d'individus no infectats amb <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd-).	46
Figura 20.-	Fotografia d'una vesícula de dermocistidi sobre <i>Lissotriton helveticus</i> a la localitat "Can Puig".	47
Figura 21.-	Fotografia d'una vesícula de dermocistidi sobre <i>Triturus marmoratus</i> a la localitat "Capçana".	48
Figura 22.-	Percentatge de localitats que han obtingut resultats positius a Bd, tenint en compte totes les espècies analitzades a cada localitat. En vermell, % localitats amb presència de Bd. En verd, % de localitats amb absència de Bd.	49
Figura 23.-	Número d'espècies positives a Bd a les diferents localitats de mostreig.	49
Figura 24.-	Presència de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) a la localitat Celrà. En verd, individus amb resultat negatiu a Bd (Bd -). En vermell, individus positius a Bd (Bd +).	50
Figura 25.-	Presència de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) a la localitat Celrà. En verd, individus amb resultat negatiu a Bd (Bd -). En vermell, individus positius a Bd (Bd +).	50
Figura 26.-	Presència de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) a la localitat Celrà. En verd, individus amb resultat negatiu a Bd (Bd -). En vermell, individus positius a Bd (Bd +).	51
Figura 27.-	Percentatge d'individus infectats amb <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd+) i no infectats amb <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd-) a cada localitat de mostreig, tenint en compte totes les espècies analitzades. En verd, % no infectats. En vermell, % infectats.	51
Figura 28.-	Percentatge de localitats que han obtingut resultats positius a Bsal, tenint en compte totes les espècies d'urodels analitzades a cada localitat. En vermell, % localitats amb presència de Bsal. En verd, % de localitats amb absència de Bsal.	52
Figura 29.-	Percentatge de localitats que han obtingut resultats positius a Ranavirus, tenint en compte totes les espècies analitzades a cada localitat. En vermell, % localitats amb presència de Ranavirus. En verd, % de localitats amb absència de Ranavirus.	52
Figura 30.-	Percentatge de localitats que han obtingut resultats positius a dermocistidis, tenint en compte totes les espècies capturades a cada localitat. En vermell, % localitats amb presència de dermocistidis. En verd, % de localitats amb absència de dermocistidis.	53

Figura 31.-	Agafant mostra de cranc vermell americà (<i>Procambarus clarkii</i>).	53
Figura 32.-	Prevalença de Bd a tòtil (<i>Alytes obstetricans</i>) a la localitat Celrà i segons l'estació de l'any en què s'han agafat les mostres. En verd, % individus, no infectats per Bd. En vermell, % individus infectats per Bd.	55
Figura 33.-	Prevalença de dermocistidi en tritó palmat (<i>Lissotriton helveticus</i>) a la localitat "Can Puig" durant l'hivern.	55
Figura 34.-	Granota pintada (<i>Discoglossus pictus</i>) trobada morta a la localitat "Madremanya", positiva a Bd.	57
Figura 35.-	Fotografia de l'estudi histològic realitzada amb microscopi òptic a la U.A.B., on es veuen esporangis de Bd assenyalats amb fletxes a la pell de la granota pintada (<i>Discoglossus pictus</i>) trobada morta a la localitat "Madremanya".	58
Figura 36.-	Mapa de distribució de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Bd) al Massís de les Gavarres. En verd, localitats aparentment lliures de Bd. En vermell, localitats on s'ha detectat Bd al llarg de l'any 2018.	59
Figura 37.-	Mapa de distribució de <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> (Bsal) al Massís de les Gavarres. En verd, localitats aparentment lliures de Bsal.	60
Figura 38.-	Mapa de distribució de Ranavirus al Massís de les Gavarres. En verd, localitats aparentment lliures de Ranavirus.	61
Figura 39.-	Mapa de distribució de dermocistidi al Massís de les Gavarres. En verd, localitats aparentment lliures de dermocistidi. En vermell, localitats on s'ha detectat dermocistidi.	62
Figura A-I.1.-	Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 de la Bassa de l'argilera de Sant Daniel, localitat "Argilera" (punt taronja), Municipi de Girona. Coordenades UTM: 487098 X, 4649649 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC.	81
Figura A-I.2.-	Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 de la Riera de Celrà, localitat "Celrà" (punt taronja), Municipi de Quart. Coordenades UTM: 486743 X, 4644091 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC.	81
Figura A-I.3.-	Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 de la Bassa de la Capçana, localitat "Capçana" (punt taronja), municipi de Cassà de la Selva. Coordenades UTM: 491290 X, 4635315 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC.	82
Figura A-I.4.-	Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 de la Resclosa de Mas Salvador, localitat "Mas Salvador" (punt taronja), municipi de Santa Cristina d'Aro. Coordenades UTM: 496767 X, 4633764 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC.	82
Figura A-I.5.-	Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 de la Bassa de Can Puig de Fitor, localitat "Can Puig" (punt taronja), municipi de Forallac.	83

Coordenades UTM: 496767 X, 4633764 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC.

- Figura A-I.6.-** Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 del Riu Daró a la Palanca de Cruïlles, localitat "Daró" (punt taronja), municipi de Cruïlles, Monells i Sant Sadurní de l'Heura. Coordenades UTM: 500750 X, 4643458 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC. **83**
- Figura A-I.7.-** Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 del Riu Rissec, prop de Monells localitat "Rissec" (punt taronja), municipi de Cruïlles, Monells i Sant Sadurní de l'Heura. Coordenades UTM: 498330 X, 4646303 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC. **84**
- Figura A-I.8.-** Mapa comparatiu topogràfic/ortofoto 1:5000 del Riu Rissec, prop de Mas Vidal localitat "Madremanya" (punt taronja), municipi de Madremanya. Coordenades UTM: 494726 X, 4646836 Y. Font: Elaboració pròpia a partir del visor de l'ICGC. **84**
- Figura A-II.1.-** Bassa de l'argilera de Sant Daniel, localitat "Argilera", Municipi de Girona. **85**
- Figura A-II.2.-** Bassa de Can Puig de Fitor, localitat "Can Puig". Municipi de Forallac. **85**
- Figura A-II.3.-** Bassa de la Capçana, localitat "Capçana". Municipi de Cassà de la Selva. **86**
- Figura A-II.4.-** Riera de Celrè, localitat "Celrè". Municipi de Quart. **86**
- Figura A-II.5.-** Riu Rissec. Localitat "Rissec". Municipi de Monells. **87**
- Figura A-II.6.-** Resclosa de Mas Salvador, localitat "Mas Salvador". Municipi de Santa Cristina d'Aro. **87**
- Figura A-II.7.-** Petita gorga de la capçalera del Riu Rissec, localitat "Madremanya". Municipi de Madremanya. Fotografia cedida pel Cos d'Agents Rurals del Gironès. **88**
- Figura A-II.8.-** Granota pintada (*Discoglossus pictus*) detectada morta a la riba d'una bassa de la localitat "Capçana", la qual ha resultat ser positiva a Bd. **89**
- Figura A-III.1.-** Fitxa de camp utilitzada durant el projecte per agafar dades herpetològiques. Font: S.A.C. (Seguiment d'Amfibis de Catalunya) (2006). **90**
- Taula 1.-** Relació d'espècies d'amfibis que es poden detectar a l'àrea d'estudi. **29**
- Taula 2.-** Resum de les mostres analitzades a la localitat "Capçana". Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*. Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*. En vermell, presència del patogen = (+). En verd, absència del patogen (-). **41**
- Taula 3.-** Resum de les mostres analitzades a la localitat "Argilera". Bd = *Batrachochytrium dendrobatidis*. Bsal = *Batrachochytrium salamandrivorans*. En vermell, presència del patogen = (+). En verd, absència del patogen (-). **42**

Taula 4.-	Resum de les mostres analitzades a la localitat "Celrà". Bd = <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . Bsal = <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> . En vermell, presència del patògen = (+). En verd, absència del patògen (-).	42
Taula 5.-	Resum de les mostres analitzades a la localitat "Can Puig". Bd = <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . Bsal = <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> . En verd, absència del patògen (-).	43
Taula 6.-	Resum de les mostres analitzades a la localitat "Madremanya". Bd = <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . Bsal = <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> . En vermell, presència del patògen = (+). En verd, absència del patògen (-).	43
Taula 7.-	Resum de les mostres analitzades a la localitat "Mas Salvador". Bd = <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . Bsal = <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> . En verd, absència del patògen (-).	43
Taula 8.-	Resum de les mostres analitzades a la localitat "Rissec". Bd = <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . Bsal = <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> . En verd, absència del patògen (-).	44
Taula 9.-	Resum de les mostres analitzades a la localitat "Daró". Bd = <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . Bsal = <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> . En verd, absència del patògen (-).	44
Taula 10.-	Resum de les espècies detectades i analitzades a tota l'àrea d'estudi. El signe (+) denota que s'ha trobat DNA del patògen corresponent a alguna de les mostres mitjançant la tècnica molecular PCR qualitativa. El signe (-) denota un resultat negatiu, no s'ha detectat DNA del patògen a cap mostra analitzada. Bd = <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . Bsal = <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> . Dc = Dermocistidi.	45
Taula 11.-	Taula-resum de la segona fase d'anàlisi (8-8-2018), que ha servit per obtenir la prevalença de Bd en tòtil (<i>Alytes obstetricans</i>) a la localitat "Celrà". En verd = Individus, no infectats per Bd (-). En vermell, individus infectats per Bd (+).	54



Consorci
Gavarres



Diputació de Girona



Generalitat de Catalunya
**Departament d'Acció Climàtica,
Alimentació i Agenda Rural**