



MATHEMATISCHE EN COMPUTATIONELE BIOLOGIE

*Verspreiding van chytridiomycose
(Batrachochytrium dendrobatidis)
in een amfibieënpopulatie*

Auteurs: Kasper Engelen (Ba informatica), Lotte Leys (Ba wiskunde) en William Verbiest (Ba biologie)

Begeleider: Charlie Beirnaert

ACADEMIEJAAR 2018-2019

Inhoudsopgave

1	Inleiding	2
2	Chytridiomycose	2
3	Data	6
3.1	Bronnen	6
3.2	Numerieke data	8
3.3	Transformaties	9
3.4	Dataverwerking in Python	10
4	Modelleren	11
4.1	SEIR(Z) model	11
4.2	SEIS(Z) model	17
5	Kleinste kwadraten	19
5.1	Algemene theorie	19
5.2	Toegepast voor het model	20
6	Mitigatie	22
6.1	Mitigatiemaatregelen	22
6.2	Evalueren van mitigatiemaatregelen met model	24
7	Taakverdeling	25
8	Referenties	26

1 Inleiding

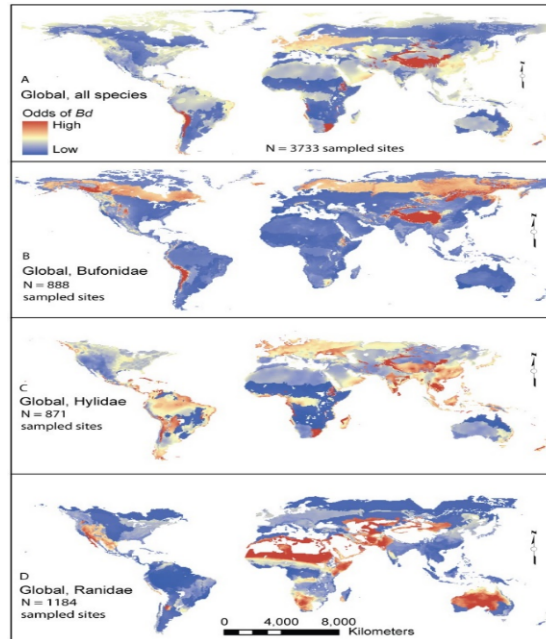
De amfibieënpopulaties nemen wereldwijd aan een snel tempo af. De drijfveer hierachter is de infectieziekte chytridiomycose. Deze ziekte wordt veroorzaakt door een schimmel *Batrachochytrium dendrobatidis*. In deze paper zal getracht worden om de dynamiek van de ziekte in een amfibieënpopulatie te modelleren aan de hand van compartimenteel modelleren. Er wordt data gebruikt van een populatie amfibieën in Panama, El Copé. Door Lips et al. (2006) werd de amfibieëndensiteit gemeten van 1998 tot en met 2005, waarbij de infectieziekte in 2004 opduikt. Er zal nadien aan de hand van het opgestelde model getest worden welke praktische (voorzorgs)maatregelen er gedaan moeten en kunnen worden om verdere verspreiding van de ziekte te beperken.

2 Chytridiomycose

Sinds de jaren 80 is er een wereldwijde afname in amfibieënpopulaties en in het aantal soorten amfibieën waargenomen. 43% van de globale soorten neemt geleidelijk af, 32,5% van de soorten zijn sterk bedreigd en zo'n 122 soorten zijn al voorgoed verdwenen (De Paula, C. D. en Catão-Dias, 2011). Een aantal mogelijke oorzaken voor de snelle afname zijn gepostuleerd, zoals invoer van exoten, overexploitatie van habitats, landgebruikveranderingen, global change (bv. klimaatverandering en UV-radiatie), pollutanten en infectieziekten (ranavirose en chytridiomycose) (Collins en Storfer, 2003).

De belangrijkste doodsoorzaak van amfibieën blijkt de infectieziekte chytridiomycose te zijn. Chytridiomycose is een infectieziekte bij amfibieën die veroorzaakt wordt door de pathogene schimmel *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) en, specifiek bij salamanders, door *B. salamandrivorans* (Longcore et al., 1999). In deze paper wordt vooral gefocust op Bd omwille van de brede gastheerspecificiteit en de hoge virulentie.

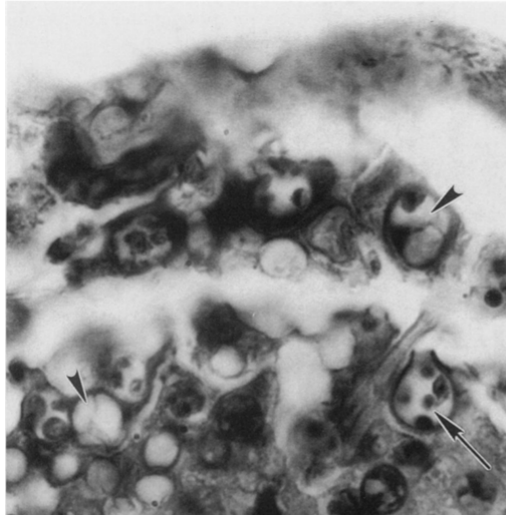
Vermoedelijk zou Bd oorspronkelijk afkomstig zijn uit Afrika (Weldon et al., 2004). Recent onderzoek stelt echter dat de virulente stamlijn van Bd waarschijnlijk afkomstig is van Oost-Azië (Koreaanse Schiereiland) en van daaruit in het begin van de 20ste eeuw door handel verspreidde rond de wereld (O'Hanlon et al., 2018). Het wijde verspreidingsgebied van Bd is voornamelijk het gevolg van het globale transport en de globale handel in dieren, zoals handel in huisdieren en zoodieren, de voedselhandel, handel in labodieren (bv. *Xenopus*), introductie van exoten door vrijlating en gebruik van biologische bestrijdingsmiddelen (bv. *Bufo marinus*) (Weldon et al., 2004). De regio's die het meest getroffen zijn door Bd zijn vooral het westen van Noord-Amerika, Centraal-Amerika, Zuid-Amerika, het oosten van Australië, Oost-Afrika, Dominica en Montserrat in de Caraïben (figuur 1) (Olson et al., 2013).



Figuur 1: geëxtrapoleerde globale kaart met de kans voor het aantreffen van Bd in amfibieën. Deze kaart is afgeleid van regressiemodellen. Dit is gedaan voor alle amfibieënsoorten (A), de soorten behorende tot de familie van de Bufonidae (B), Hylidae (C) en Ranidae (D) (Olson et al., 2013; Bd-Maps, <http://www.bd-maps.net/maps/>).

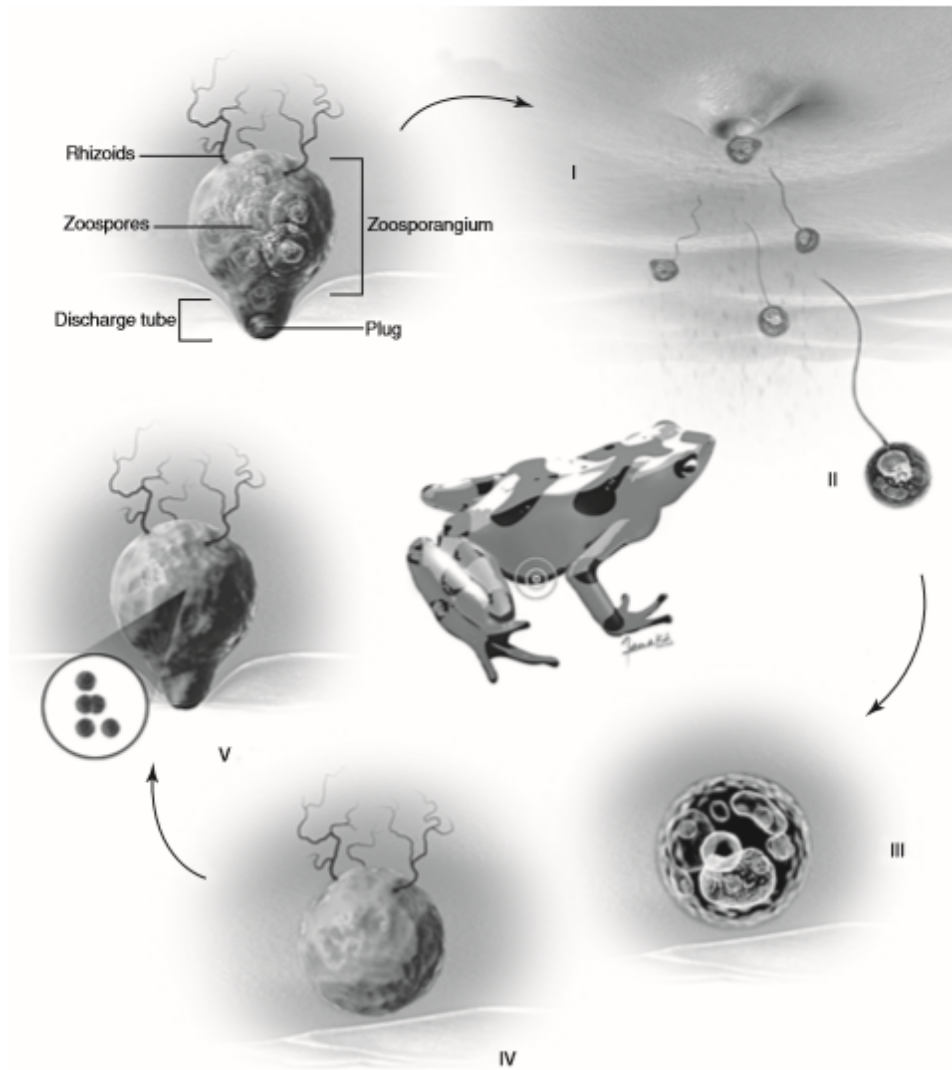
De schimmel behoort tot de Chytridiomycetes (Rijk Fungi, Stam Chytridiomycota). Dit zijn wijdverspreide heterotrofe schimmels die vooral terug te vinden zijn in water en in de bodem. De meeste fungi van de Chytridiomycetes zijn saprofyt, wat wil zeggen dat ze van dood organisch materiaal leven. Vele soorten zijn echter ook parasitair op planten, algen en dieren (O’Hanlon et al., 2018).

De schimmel Bd beperkt zich vooral tot het gekeratiniseerd epithelium in de huid van juveniele en adulte amfibieën. Daarnaast wordt de orale schijf van kikkervisjes ook aangetast. De schimmel voedt zich met suikers, proteïnen (voornamelijk keratine) en aminozuren die aanwezig zijn in de huid en de orale schijf (Vazquez et al., 2009). De dood van het amfibiespecimen wordt veroorzaakt door disruptie van de cutane fysiologische functies, meer bepaald de osmoregulatie (Longcore et al., 1999). Veranderingen in de elektrolytenbalans en pH ter hoogte van de amfibie-epidermis leiden tot een asystolie (het ontbreken van elektrische activiteit van het hart met een hartstilstand tot gevolg) (Voyles et al., 2009).



Figuur 2: haematoxyline en eosine-gekleurde sectie van de epidermislaag van een met Bd geïnfecteerde blauwe pijlgifkikker. De pijl duidt een opengebroken zoösporangium aan, de pijlpunten duiden koloniale sporangia aan. De bovenkant van de figuur is de oppervlakte van de huid. Deze sporangia zijn al latere stadia van de fungus. In diepere lagen zijn er jongere stadia te vinden (Longcore et al., 1999).

De schimmel verspreidt zich door middel van zoösporen die in water 1-2 cm kunnen voortbewegen. Voortbeweging is mogelijk doordat ze zijn uitgerust met een flagellum (Longcore et al., 1999). Dergelijke geflagelleerde sporen zijn typisch voor de Chytridiomycota. De sporen kunnen zeer gericht zwemmen naar de volgende gastheer door aan chemotaxis te doen. De zoösporen worden gevormd in het zoösporangium. Wanneer de sporen via het water een nieuwe gastheer gevonden hebben, dan dringen ze de huid binnen van het amfibie om vervolgens te encystreren in de epidermis. Deze cyste geeft opnieuw aanleiding tot een zoösporangium. De levenscyclus wordt in figuur 3 verder toegelicht.



Figuur 3: Levenscyclus van Bd in een amfibie. I, een mature thallus (zoösporangium) in een keratinocyt (huidcel van amfibie) produceert en verspreidt geflagelleerde zoösporen in de omgeving door een klein uitstekend kanaaltje. II, Zoösporen bewegen zich voort over een korte afstand of worden meegevoerd door de stroming van het water. III en IV, de zoöspore komt een andere keratinocyt van hetzelfde of een ander amfibie tegen en begint met de ontwikkeling van een nieuwe thallus in het celcytoplasma. V, het cytoplasma van de thallus deelt zich op zodanig dat er nieuwe zoösporen gevormd worden. Die sporen vermeerderen in het nieuwe zoösporangium en een nieuwe cyclus kan ingezet worden (Pessier, 2014).

Een spore heeft ongeveer 24 uur om een volgende gastheer te vinden en te encystreren alvorens te sterven. Overdracht van de infectieziekte gebeurt via direct contact tussen geïnfecteerde amfibieën en via contact tussen een amfibie en een zoöspore-bevattende poel met water (als gevolg van een dode kikker). Onder laboratoriumomstandigheden kunnen de sporen in steriel zand en vogelveren gedurende 3 maanden overleven. Watervogels, vissen, voertuigen en wandelschoenen kunnen waarschijnlijk ook als vector fungeren (Jo-

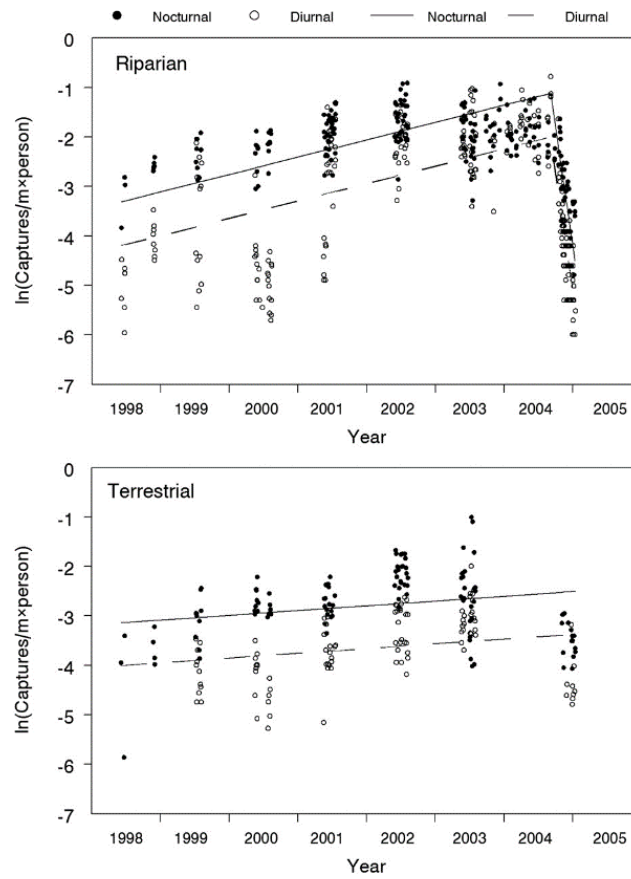
hanson en Speare, 2005). Met dergelijke vectoren werd niet echt rekening gehouden in deze paper, wegens de complexiteit van dergelijke dynamieken. Er werd enkel rekening gehouden met de capaciteit van de sporen om aan dispersie te doen en het direct contact tussen de amfibieën.

De incubatieperiode in een amfibie ligt tussen de 10 en 47 dagen, en een geïnfecteerd amfibie kan een infectie gedurende 24 à 220 dagen dragen vooraleer te sterven (Lips et al., 2006). De optimale groeitemperatuur voor Bd is 23°C. Bij 28-29°C stagneert de groei en in vitro-experimenten tonen aan dat Bd sterft bij temperaturen boven de 30°C (Longcore et al., 1999). Bd kan bij koude temperaturen overleven en groei is optimaal bij koelere temperaturen. Het zijn dan ook vooral de amfibieën die leven op hogere hoogtes die sterker afnemen in getallen. In deze paper werd geen rekening gehouden met de impact van temperatuurfluctuaties in het gebied en de respons van Bd op dergelijke omgevingsfluctuaties. Dit zou echter nog een interessante toevoeging kunnen zijn aan het model.

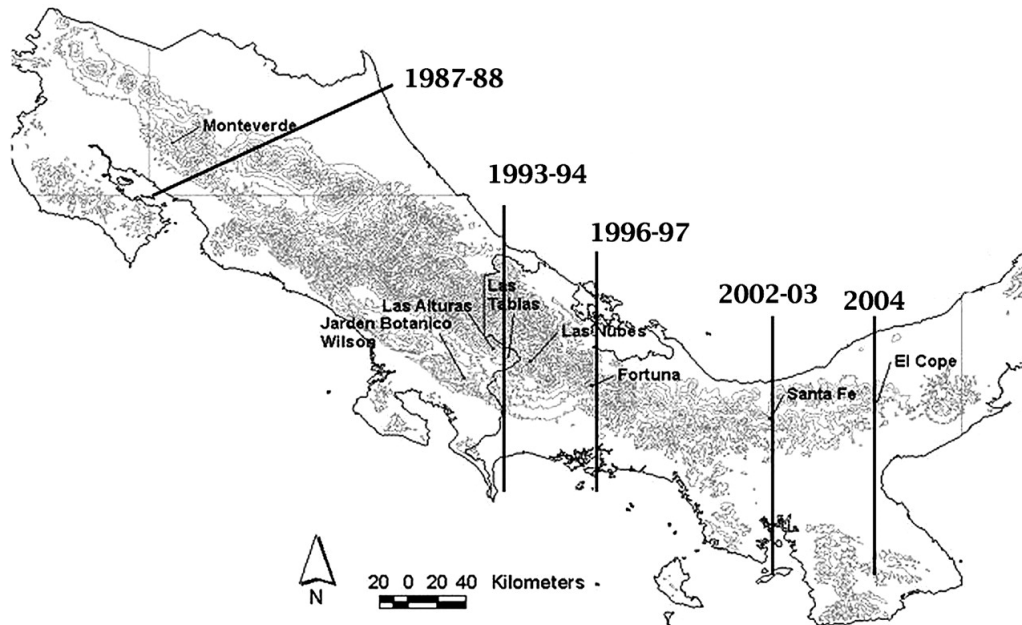
3 Data

3.1 Bronnen

De data werden gehaald uit Lips et al. (2006). In deze paper wordt beschreven hoe de populatie in El Copé, Parque Nacional G. D. Omar Torrijos H., Panama (8° 40' N, 80° 37' 17" W; oppervlakte = 252 km²) fluctueert van 1998 tot en met 2005 (figuur 4). In oktober 2004 werd Bd voor het eerst in deze regio waargenomen, waarbij de schimmel waarschijnlijk door amfibieën die uit Costa Rica afkomstig waren, werd geïntroduceerd (figuur 5). De amfibiedensiteiten werden op een aantal transecten in de gebieden bepaald door het aantal vangsten te delen door het aantal meter dat gelopen werd en het aantal personen dat de vangst deed op het belopen transect. Hiervan werd het natuurlijk logaritme genomen. Er werd zowel aan stroompjes ('riparian'; 4 transecten) als aan meer terrestrische biotopen ('terrestrial'; 3 transecten) gesampled. De terrestrische biotopen zijn vooral dicht tropisch regenwoud. De transecten waren permanent en werden per week twee keer ('nocturnal' en 'diurnal') gesampled. De stroomtransecten werden van augustus 2003 tot en met september 2004 twee keer in de maand gesampled. Stroomtransecten werden gesampled met een tijdsinterval van 1-3 dagen. Wanneer dode kikkers werden gevonden in 2004, werd de samplefrequentie verhoogd (Lips et al., 2006). In totaal werden 698 transect surveys gedaan met een totale belopen afstand die gelijk is aan 187 km. Hiervoor was meer dan 1301 uur nodig. Het totaal aantal gevangen amfibieën is gelijk aan 29,645 (Lips et al., 2006). De keuze voor het zoeken van een dataset met gegevens over chytridiomycose in Centraal-Amerika is vooral door het feit dat Centraal-Amerika een belangrijke biodiversiteitshotspot is voor amfibieën. Volgens Duellman et al. (1999) herbergt de neotropische regio ongeveer de helft van de globale amfibieënpopulaties en is de diversiteit aan amfibieën er zeer hoog ten opzichte van andere plaatsen op aarde.



Figuur 4: amfibiedensiteiten ($\ln(\text{captures}/(\text{aantal meter} \cdot \text{aantal personen}))$) en statistische modellen voor ‘riparian’ en ‘terrestrial’ transecten tussen 1998 en 2005 (Lips et al., 2006).

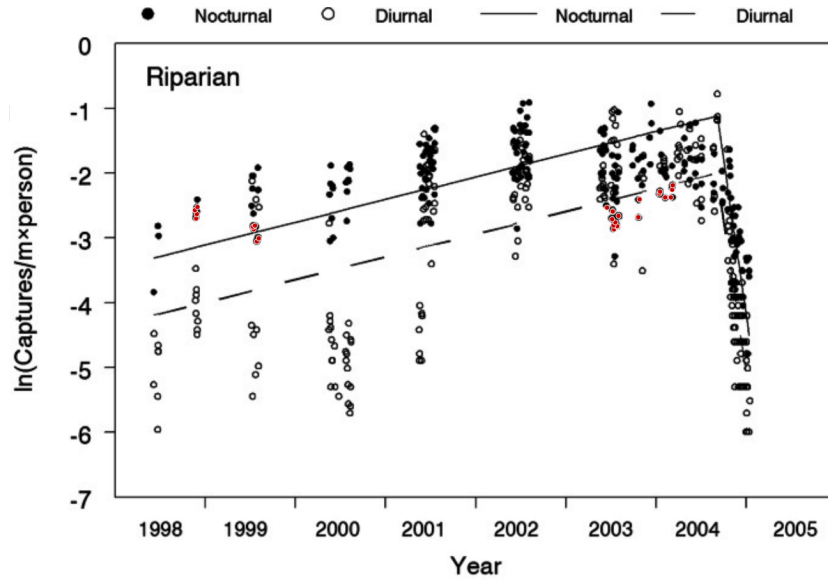


Figuur 5: kaart van Centraal-Amerika met de locaties waar een daling in de amfibieënpopulaties werd vastgesteld (hoogstwaarschijnlijk als gevolg van Bd, andere complicerende factoren zijn echter niet uit te sluiten). De lijnen stellen de locaties en overeenkomstige jaartallen van de populatiedaling voor. De schimmel is waarschijnlijk in Panama geïntroduceerd vanuit Costa Rica (Lips et al., 2006).

3.2 Numerieke data

Om het model te fitten aan de grafiek in het artikel was er nood aan de originele data om zo de populatieaantallen doorheen de tijd te kennen. Aangezien de data niet in numeriek formaat voorzien waren, moest deze data uit de grafiek gehaald worden. Om dit te doen werd er gebruikgemaakt van de online tool WebPlotDigitizer (figuur 6). Deze tool laat toe een grafiek of een andere visuele voorstelling van data te uploaden om er vervolgens de numerieke data uit te extraheren en deze te exporteren in `.csv` formaat.

Een belangrijk nadeel aan deze tool is dat de geëxporteerde data niet 100% accuraat zijn. Het is namelijk zo dat datapunten onduidelijk kunnen zijn, of dat de gebruiker fouten kan maken bij het aanduiden van de punten en curves.



Figuur 6: Screenshot van WebPlotDigitizer met enkele gemarkeerde datapunten.

3.3 Transformaties

De data werden gegeven in de vorm

$$\ln \frac{\text{captures}}{\text{aantal meter} \cdot \text{persoon}},$$

maar er was eerder interesse in de densiteit van de amfibieën in het gegeven gebied. Zoals eerder vermeld, wordt er een terrestrisch gebied met dicht tropisch regenwoud en een gebied dat gelegen is aan de rivieroever besproken. Als een persoon door 'riparian' gebied liep zal die waarschijnlijk een breder zicht gehad hebben dan wanneer hij door het 'terrestrial' gebied liep, omwille van de dichtheid van begroeiing. De vegetatie in Parque Nacional G. D. Omar Torrijos H. is dichts tropisch regenwoud (Lips et al., 2006). Daarom werd verondersteld dat wanneer de persoon aan de oever loopt, de persoon in kwestie de amfibieën kon vangen die binnen 4 meter van hem verwijderd zijn. Als de persoon door het bos loopt, werd verondersteld dat hij de amfibieën die maar 3 meter van hem verwijderd zijn kon vangen. Om de densiteit uit onze data te halen, werd de volgende formule vervormd: $\ln \frac{\text{captures}}{\text{m} \cdot \text{persoon}}$. Er werd aangenomen dat 1 persoon alle trails gelopen heeft. Dit is een assumptie die gemaakt moest worden, aangezien in de paper van Lips et al. (2006) er enkel de totale survey lengte wordt gegeven. We kunnen de survey dan voorstellen als één grote survey afgelegd door één persoon. Er geldt dan :

$$\frac{\text{Captures}}{\text{meter}} = \exp(\text{datapunt})$$

Dit gedeeld door de breedte die de persoon op het pad kon zien:

$$\frac{\text{Captures}}{\text{lengte trail} \cdot \text{breedte trail}} = \frac{\exp(\text{data})}{\text{breedte trail}}$$

Zo werd het aantal (gevangen) dieren per m^2 verkregen. Voor het aantal dieren in 'riparian' en 'terrestrial' gebied, werd de densiteit in dat gebied met de respectievelijke oppervlakte van het gebied vermenigvuldigd. Het totale gebied waar de metingen werden gedaan bedraagt $252 km^2$. Er werd verondersteld dat 5% hiervan 'riparian' is. Dit werd geschat op basis van topografische kaarten van het gebied (ArcGIS, 2019). Dit kwam overeen met $12,6 km^2$ 'riparian' gebied. 95%, 'terrestrial' gebied komt dan overeen met $239,4 km^2$.

Het aantal dieren aan de oever bedroeg:

$$\frac{\# \text{ dieren}}{m^2} \cdot \text{opp. riparian gebied} = \frac{\exp(\text{data}) \cdot \text{opp. rip. gebied}}{\text{breedte trail}} = \frac{\exp(\text{data}) \cdot 12600000 m^2}{4}$$

Het aantal dieren in het bos bedroeg:

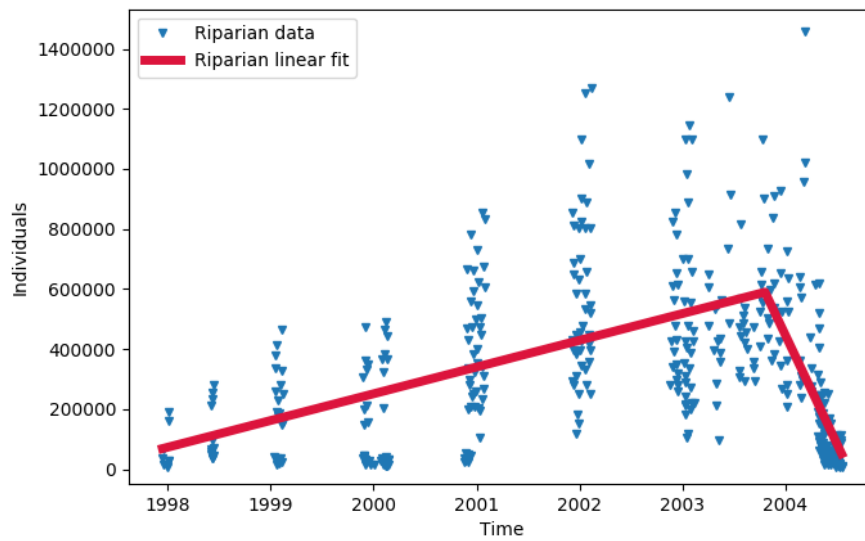
$$\frac{\# \text{ dieren}}{m^2} \cdot \text{opp. terrestrial gebied} = \frac{\exp(\text{data}) \cdot \text{opp. terr. gebied}}{\text{breedte trail}} = \frac{\exp(\text{data}) \cdot 239400000 m^2}{3}$$

3.4 Dataverwerking in Python

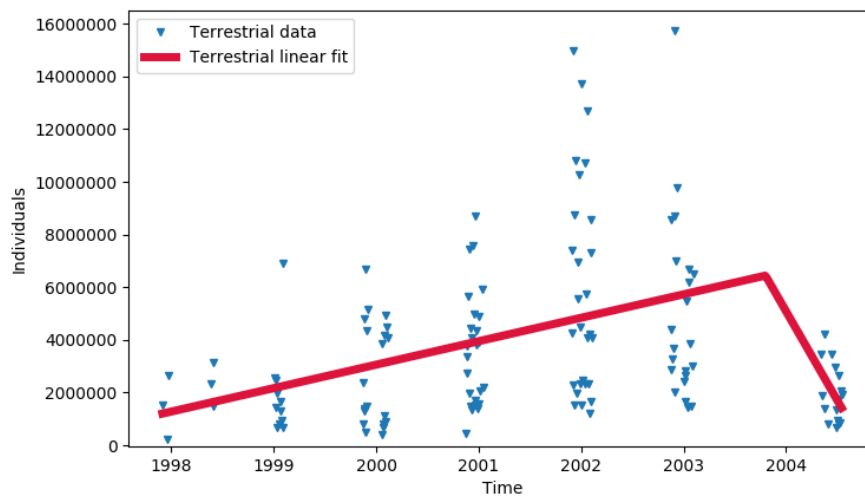
Eenmaal dat de data voorzien waren in .csv formaat, werd er gebruikgemaakt van de Python programmeertaal alsook de NumPy, SciPy, Pandas en Matplotlib libraries. Pandas werd voornamelijk aangewend om csv-bestanden in te lezen, alsook deze te sorteren en te filteren waar nodig. NumPy was zeer nuttig om bewerkingen uit te voeren op grote hoeveelheden numerieke data. SciPy voorzag dan weer wiskundige tools om curves aan data te fitten. Tenslotte werd Matplotlib gebruikt om plots te maken van de data en de modellen.

Allereerst werden de csv-bestanden ingelezen en getransformeerd met behulp van de formules uit de voorafgaande subsectie. In de 'terrestrial' dataset werden er ook twee outliers verwijderd, namelijk (2003.04169424222, -1.09656854518222) en (2003.02448709464, -1.00687145937764). Vervolgens werden de data opgesplitst in pre-outbreak data en post-outbreak data. Beide resulterende datasets werden gefit met elk één rechte. Het begin en eindpunt van respectievelijk de pre-outbreak en post-outbreak data werden gelijkgesteld, zodat deze samen één fittende curve vormden. Deze curve werd dan gebruikt om de modellen zowel visueel als numeriek aan de data te fitten.

2003.8 werd genomen als het tijdstip van de outbreak, wat overeenkomt met 20 oktober 2003. In het artikel van Lips et al. (2006) werd er gesproken van een outbreak datum rond september 2004, maar aangezien de data een afname in populatiedichtheid tonen eind 2003, werd september 2004 niet genomen als begin van de outbreak daar het model overeen moest stemmen met de beschikbare data. Het kan zijn dat de schimmel al aanwezig was in het gebied en een effect had op de populatieaantallen zonder dat Lips et al. (2006) de schimmel op een gevangen individu door middel van PCR identificeerden. Dit door het feit dat Bd in een kleine fractie van de amfibieën aanwezig was. Het vaststellen van de aanwezigheid van Bd is afhankelijk van de kans dat een bepaald individu in de populatie de infectie heeft. Als deze klein is, dan is de kans dat een gevangen individu de infectieziekte heeft ook miniem. Figuren 7 en 8 tonen de uiteindelijke data waaraan het model gefit is.



Figuur 7: Plot van de getransformeerde 'riparian dataset' met bijhorende fit.



Figuur 8: Plot van de getransformeerde 'terrestrial' dataset met bijhorende fit.

4 Modelleren

4.1 SEIR(Z) model

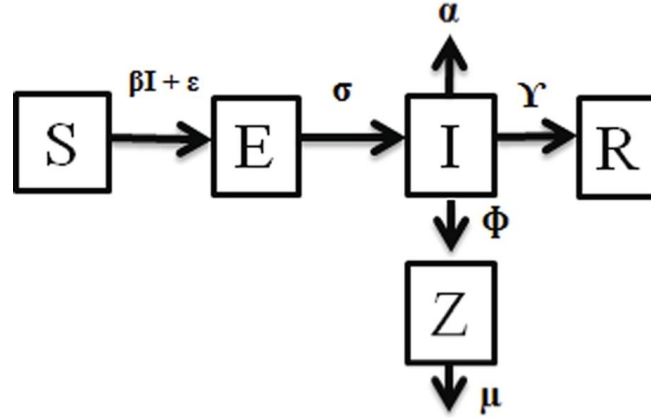
Als model werd eerst gekozen voor een SEIR model. Lips et al. (2006) stellen dat chytridiomycose zich als een dergelijk model gedraagt. Het model zelf werd gebaseerd op de paper van Al-Shorbaji et al. (2015) (figuur 9). Deze paper gaat over de verspreiding

van een andere parasiet, meer bepaald *Sphaerothecum destruens*, in een populatie van vissen. De levenscyclus van deze protist is gelijkaardig aan Bd. De sporen hebben ook een flagel en zijn afhankelijk van water. Wanneer ze een vis tegenkomen, dan worden de sporen opgegeten of hechten ze zich vast aan de kieuwen, huid of de darmwand van de vis. Transmissie kan ook, zoals bij Bd, via direct contact tussen individuen plaatsvinden. De sporen gaan dan intracellulair zich vermenigvuldigen, totdat apoptose van de cel optreedt (Al-Shorbaji et al., 2015). De belangrijkste reden voor gebruik van dit model als referentie is de toevoeging van het compartiment Z aan het SEIR model. Z stelt het aantal zoösporen voor dat de geïnfecteerde individuen vrijgeven. Dit compartiment is van belang, omdat besmetting door Bd niet enkel alleen door direct contact tussen individuen plaatsvindt maar ook als gevolg van de door het water bewegende sporen.

Verder stelt S in het SEIR model het aantal ‘susceptible’ individuen voor (Earn, 2000). De ‘susceptible’ individuen worden geïnfecteerd door directe transmissie aan een snelheid $\beta I + \epsilon$. Dit is het gevolg van direct contact met amfibieën die infectieus zijn (I). Daarnaast wordt de infectiesnelheid ook bepaald door ϵ , i.e. de milieutransmissie. Dit laatste is het gevolg van het vrijgeven van de in het water bewegende zoösporen. E is het aantal ‘exposed’ individuen. Deze individuen zijn al geïnfecteerd, maar zijn zelf nog niet infectieus en kunnen de facto nog geen sporen verspreiden in de omgeving (Earn, 2000; Al-Shorbaji et al., 2015). De ‘exposed’ individuen worden infectieus aan een snelheid σ . I is dan het aantal ‘infected’ individuen. Deze individuen zijn infectieus en verspreiden zoösporen in de waterige omgeving. De zoösporen worden weergegeven door het compartiment Z. De snelheid waarmee de infectieuze individuen zoösporen vrijgeven is gelijk aan Φ . De collectieve mortaliteit van de zoösporen is gelijk aan μ . k is het aantal sporen dat nodig is zodanig de kans op infectie 50% is (Al-Shorbaji et al., 2015). Zonder deze term in de formules zou Bd meer individuen infecteren dan normaal in realiteit biologisch plausibel zou zijn. Infectieuze individuen kunnen echter ook sterven als gevolg van chytridiomycose. Dit vindt plaats aan een snelheid α . Ze kunnen echter ook immuun worden of herstellen aan een snelheid γ . R is dus het aantal ‘recovered’ individuen. S, E, I en R stellen een aantal individuen in een compartiment voor op een bepaald tijdstip (Earn, 2000). Tussen deze compartimenten zijn er fluxen. Deze fluxen worden beschreven door volgende formules:

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dt} &= -\beta SI - \epsilon \left(\frac{Z}{Z+k} \right) S + \Lambda \\ \frac{dE}{dt} &= \beta SI + \epsilon \left(\frac{Z}{Z+k} \right) S - \sigma \left(\frac{Z}{Z+k} \right) E \\ \frac{dI}{dt} &= \sigma \left(\frac{Z}{Z+k} \right) E - \gamma \left(\frac{Z}{Z+k} \right) I - \alpha \left(\frac{Z}{Z+k} \right) I \\ \frac{dR}{dt} &= \gamma \left(\frac{Z}{Z+k} \right) I \\ \frac{dZ}{dt} &= \Phi I - \mu Z\end{aligned}$$

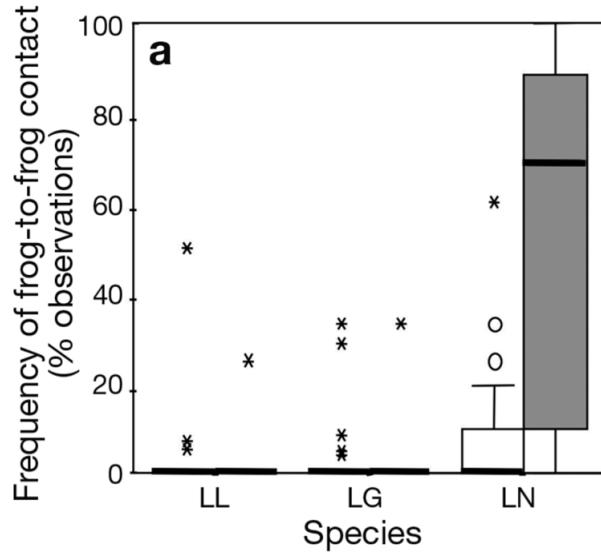
Dit SEIR(Z) model werd eerst gebruikt om Bd te modelleren in een amfibieënpopulatie. De parameters in het model werden in de literatuur opgezocht. Er werd getracht de



Figuur 9: het SEIR(Z) model met ‘susceptible’ individuen (S) die blootgesteld zijn aan infectie aan een snelheid β (directe transmissie) + ϵ (milieutransmissie). ‘Exposed’ individuen (E) worden ‘infectious’ (I) aan een snelheid σ . Individuen die infectieus geworden zijn, sterven ofwel aan de ziekte aan een snelheid α ofwel herstellen ze aan een snelheid γ . Die laatste gaan naar de ‘recovered’ individuen (R). Individuen die infectieus zijn die laten sporen vrij in de omgeving aan een snelheid Φ . Deze zoösporen hebben een collectieve mortaliteitsnelheid μ (Al-Shorbaji et al., 2015).

parameters zo goed mogelijk in te passen in het model. Dit werd gedaan door de parameterwaarden te gebruiken die het best bij de data pasten. Enkele parameters zijn specifiek voor een bepaalde soort of zijn gemeten in laboratoriumomstandigheden. Aangezien de dataset van Lips et al. (2006) de afname in populaties heeft gemeten van alle aanwezige amfibieënsoorten, zal het moeilijk zijn om de modellen perfect af te stemmen op de realiteit. Vaak zijn de responsen op Bd zeer soortspecifiek. Zonder het maken van veralgemeningen in sommige soortspecifieke parameters zou echter de data van Lips et al. (2006) niet kunnen gebruikt worden om een model op te bouwen. De assumpties werden dan ook getracht biologisch zo plausibel mogelijk te laten zijn.

β is de directe transmissie tussen amfibieën door direct contact. Hiervoor werd een gedragsstudie op Australische kikkers gebruikt, waarbij de soorten *Litoria lesueuri*, *L. genimaculata* en *L. nannotis* werden onderzocht. In figuur 10 staat de frequentie van kikker-tot-kikker contact afgebeeld tussen individuen van één van deze drie soorten (Rowley en Alford, 2007). Uit deze waarden werd 0.15 dag^{-1} genomen. Dit is gemiddeld gezien over de drie soorten. De soortsspecificiteit van dergelijk gedrag is hier een nadeel. Er werd echter geen enkele andere studie gevonden die dergelijke informatie bevatte of die β beter kon doen schatten. Hierdoor kan niet met zekerheid worden gesteld dat deze parameter volledig de realiteit waarheidsgetrouw beschrijft. De parameterwaarde in termen van jaren is gelijk aan 54.75 jaar^{-1} .



Figuur 10: frequentie van kikker-tot-kikker contact (% observaties) in *Litoria lesueuri* (LL), *L. genimaculata* (LG) en *L. nannotis* (LN) in het droge (witte boxplot) en natte (grijze boxplot) seizoen (Rowley en Alford, 2007).

ϵ is de milieutransmissie van Bd via zoösporen. Hiervoor werd uit het artikel van Johnson en Briggs (2011) de snelheid van succesvolle zoösporetransmissie gebruikt. In het artikel werd dit $-\ln(\beta)$ genoemd, maar dit is niet dezelfde β die gebruikt wordt in deze paper. De waarde was gelijk aan $9,21 \text{ dag}^{-1}$ met een range die varieerde tussen $9,12 - 9,36 \text{ dag}^{-1}$ (Johnson en Briggs, 2011). In dit model is ϵ gelijk aan $\exp(-9.21) \cdot 365 = 0.036512426 \text{ jaar}^{-1}$ voor de 'riparian' populatie. Voor de 'terrestrial' populatie is deze gelijk aan 0. Deze assumptie werd gemaakt, omdat de sporen van Bd water nodig hebben om zich te verspreiden. Dit is natuurlijk een oversimplificatie van de realiteit, aangezien er in tropisch regenwoud ook kleinere poeltjes en waterfilmen bevinden in terrestrische biotopen. De aanname moest echter gemaakt worden om de complexiteit van het model te reduceren.

σ is de snelheid waarmee de 'exposed' individuen infectieus worden. Hiervoor werd de incubatieperiode van de schimmelinfectie gebruikt. In een amfibie is dit gelijk aan 10-47 dagen (Lips et al., 2006). In dit model werd gekozen voor de laagste waarde, namelijk 10 dagen. σ is dus gelijk aan $1/10 \cdot 365 \text{ jaar}^{-1}$.

k is het aantal zoösporen dat nodig is voor 50 procent kans op infectie. Dit was echter niet te vinden in de literatuur. Wat wel in de literatuur te vinden is, is de gemiddelde infectie load threshold. Die is gelijk aan 10000 zoösporen (Stockwell et al., 2010). Er zijn minstens 10000 zoösporen nodig om zo goed als zeker geïnfecteerd te zijn met Bd als amfibie. Onder deze threshold is infectie beduidend minder waarschijnlijk. In het artikel van Stockwell et al. (2010) zelf staat echter niets gegeven over welke kans op infectie het amfibie dan heeft wanneer het wordt blootgesteld aan een dergelijk aantal zoösporen. Dit werd echter genomen als waarde voor k . Zonder deze assumptie te maken kon het model niet worden opgesteld. Verder onderzoek zou echter moeten uitwijzen waar de k waarde

voor Bd aan gelijk is om preciezer te modelleren.

α is de sterftesnelheid van de amfibieën. Dit werd afgeleid uit de duur vooraleer een geïnfecteerd amfibie sterft. Dit varieert van 24 tot en met 220 dagen (Lips et al., 2006). Er werd gekozen voor 24 dagen. α is hierdoor gelijk aan $1/24 \cdot 365 \text{ jaar}^{-1}$.

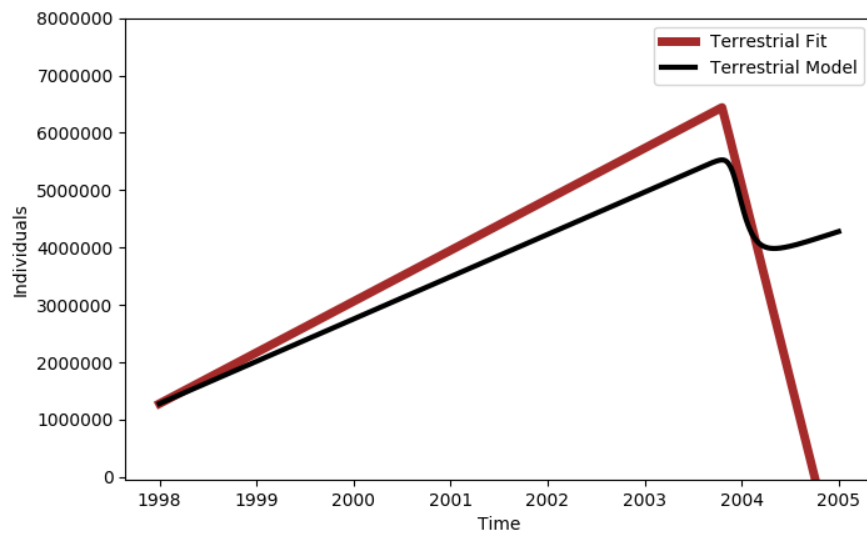
γ is de herstelsnelheid van de amfibieën. Om deze parameter te berekenen werd een studie gebruikt, waarbij men de temperatuursafhankelijke respons van een Bd-infectie bij *Silurana tropicalis* onder laboratoriumomstandigheden tracht te achterhalen. Hieruit bleek dat de herstelsnelheid bij 26 graden Celsius gelijk is aan $0,071 \text{ dag}^{-1}$ (Ribas et al., 2009). γ is dus $0.071 \cdot 365 = 25.915 \text{ jaar}^{-1}$.

Φ is de snelheid waarmee geïnfecteerde individuen sporen vrijlaten in de waterrijke omgeving. Hiervoor werd de snelheid van zoösporeproductie gebruikt als parameterwaarde. Deze snelheid is gelijk aan 38.5 dag^{-1} met een range $26.9 - 51.4 \text{ dag}^{-1}$ (Voyles et al., 2012). Er werd gekozen voor 51.4 dag^{-1} , waarbij Φ gelijk is aan $51.4 \cdot 365 = 18761 \text{ jaar}^{-1}$.

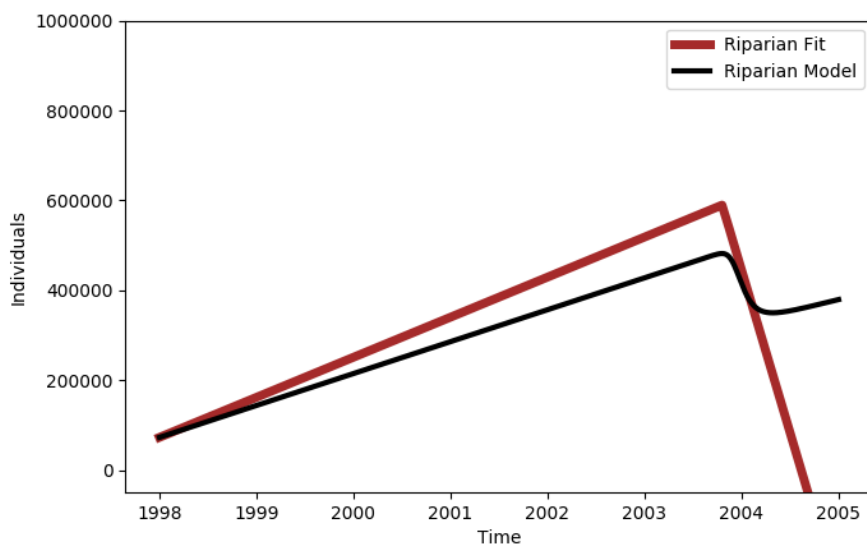
μ is de collectieve mortaliteitsnelheid van de zoösporen. Uit Piotrowski et al. (2004) werd de per capita sterftesnelheid gehaald. Deze sterfte is het gevolg van een natuurlijke dood. Deze is gelijk aan 52 jaar^{-1} met een range $1-365 \text{ jaar}^{-1}$ (Piotrowski et al., 2004). Voor het model werd een μ -waarde gelijk aan 10 jaar^{-1} genomen.

Om de natuurlijke populatiegroei te modelleren werd er nog een extra parameter Λ toegevoegd. De waarde van deze parameter is het aantal individuen dat er jaarlijks in een populatie geboren wordt relatief ten opzichte van de beginpopulatie in 1998. De waarde van deze parameter werd bepaald met behulp van een fitting algoritme dat gebruikmaakt van de kleinste-kwadratenmethode.

De fitting gebeurde in twee rondes om een zo nauwkeurig mogelijk resultaat te bekomen. Gedurende de eerste ronde werden $\Lambda \in [0, 1]$ uitgetest, gedurende de tweede ronde werden $\Lambda \in [0.55, 0.59]$ voor 'terrestrial' en $\Lambda \in [0.95, 0.99]$ voor 'riparian' uitgetest. De uiteindelijke waarden voor Λ bedroegen 0.5760521042084168 voor 'terrestrial' en 0.9759519038076151 voor 'riparian'.



Figuur 11: Resultaten van het SEIRZ model voor 'terrestrial'.



Figuur 12: Resultaten van het SEIRZ model voor 'riparian'.

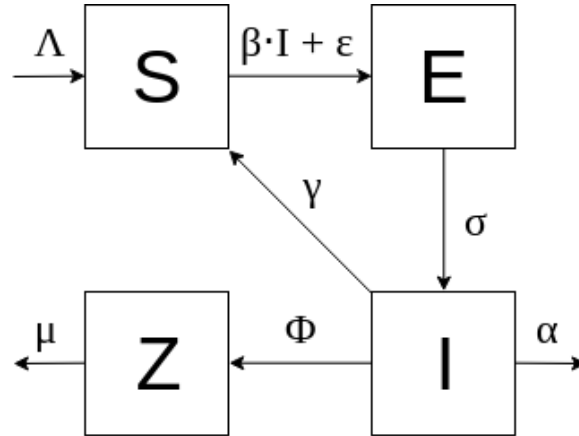
Aan figuren 11 en 12 is duidelijk te zien dat het SEIR(Z) model niet overeenkomt met de data, aangezien het model een populatiegroei weergeeft na de outbreak, terwijl de populatie volgens de data zou moeten dalen. De reden hiervoor is dat er enerzijds een populatiegroei is, en anderzijds een 'recovered' compartiment (R) is. Er zal telkens een deel van de aangegroeide populatie terechtkomen in het R compartiment waardoor deze tot in het oneindige zal groeien. Om dit probleem te verhelpen werd het R compartiment verwijderd, wat resulteert in een SEIS(Z) model.

4.2 SEIS(Z) model

Het SEIS(Z) model is gebaseerd op het SEIR(Z) model en verschilt enkel in het feit dat het 'recovered' compartiment (R) niet langer aanwezig is. Alle individuen die normaal gezien in het R compartiment terecht zouden komen, worden nu bij het S compartiment gevoegd waardoor deze wederom besmet kunnen worden. Er is echter weinig gekend over het vermogen van amfibieën om een vorm van immuniteit te vertonen voor Bd. Er wordt vermoed dat dit zou kunnen door antimicrobiële peptiden te produceren in de huid en/of door antilichamen in de mucus af te scheiden (Ramsey et al., 2010). Het vermogen tot het vertonen van immuniteit is daarnaast waarschijnlijk ook zeer soortspecifiek (Ramsey et al., 2010). Hier werd gekozen voor een model waarbij de individuen niet immuun kunnen worden voor Bd. Dit model paste het beste bij de data. De volgende formules werden gebruikt voor het SEIS(Z) model:

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dt} &= -\beta SI - \epsilon \left(\frac{Z}{Z+k} \right) S + \gamma \left(\frac{Z}{Z+k} \right) I + \Lambda \\ \frac{dE}{dt} &= \beta SI + \epsilon \left(\frac{Z}{Z+k} \right) S - \sigma \left(\frac{Z}{Z+k} \right) E \\ \frac{dI}{dt} &= \sigma \left(\frac{Z}{Z+k} \right) E - \gamma \left(\frac{Z}{Z+k} \right) I - \alpha \left(\frac{Z}{Z+k} \right) I \\ \frac{dZ}{dt} &= \Phi I - \mu Z\end{aligned}$$

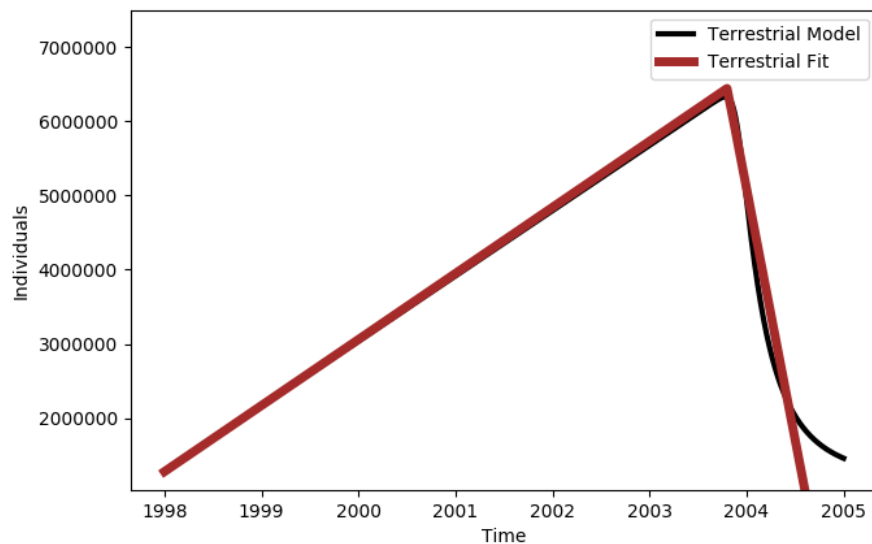
In figuur 13 worden de compartimenten en de bijhorende fluxen schematisch voorgesteld. Er is duidelijk te zien hoe de individuen die genezen van de infectie terug bij de susceptibles worden geplaatst zodat deze wederom besmet kunnen worden.



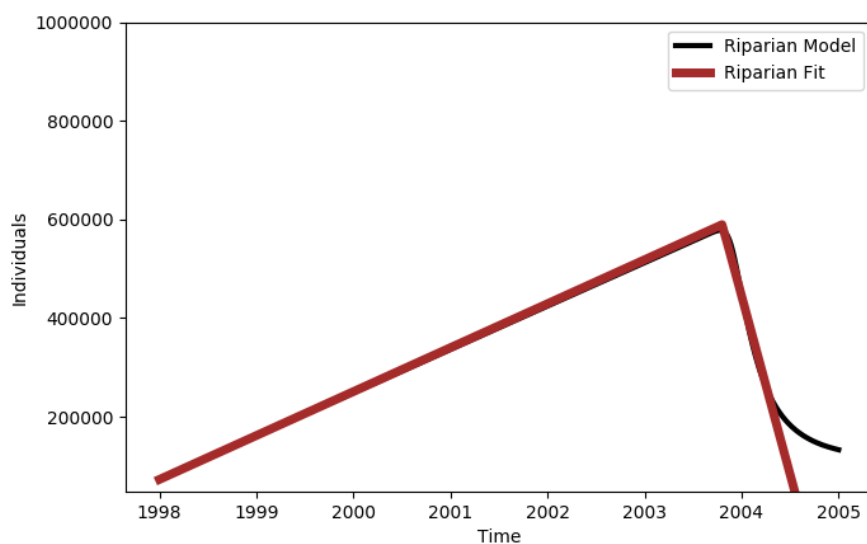
Figuur 13: De verschillende compartimenten van het SEISZ model met bijhorende fluxen.

De parameters die voor het SEIR(Z) model uit de literatuur kwamen, zijn hetzelfde gebleven voor het SEIS(Z) model. Voor de Λ parameter is er echter een nieuwe fitting gedaan.

De fitting gebeurde wederom in twee rondes vanwege de nauwkeurigheid. Voor de eerste ronde werden $\Lambda \in [0, 1]$ voor 'terrestrial' en $\Lambda \in [1, 2]$ voor 'riparian' geprobeerd. In de tweede ronde werden deze intervallen verkleind. Ditmaal werden $\Lambda \in [0.66, 0.70]$ voor 'terrestrial' en $\Lambda \in [1.18, 1.22]$ voor 'riparian' geprobeerd. De resulterende waarden waren $\Lambda = 0.6864529058116232$ voor 'terrestrial' en $\Lambda = 1.2085370741482966$ voor 'riparian'.



Figuur 14: Resultaten van het SEIS(Z)model voor 'terrestrial'.



Figuur 15: Resultaten van het SEIS(Z) model voor 'riparian'.

Figuren 14 en 15 tonen visueel aan dat het model goed overeenkomt met de data. De uiteindelijke residual bepaald met de kleinste kwadratenmethode is 663732311983663.6 voor 'terrestrial' en 13339731851114.621 voor 'riparian'.

5 Kleinste kwadraten

5.1 Algemene theorie

De datapunten (x_i, y_i) , voor $i = 1, \dots, n$, zijn gegeven. Men wil een functie $\hat{y} = f(x)$ verkrijgen die het beste aan deze data fit. Dit betekent dat de afwijking tussen de datapunten en \hat{y} zo klein mogelijk wordt gewenst, m.a.w. het residu $r_i = |y_i - \hat{y}_i| = |y_i - f(x_i)|$ minimaal voor alle i . Voor de totale afstand van alle datapunten tot de functie wordt gebruik gemaakt van de l^2 benadering. Men wil $\sqrt{\sum_{k=1}^n (y_k - f(x_k))^2}$ minimaliseren, of m.a.w. een functie $\phi = \sum_{k=1}^n (y_k - f(x_k))^2$ minimaliseren. Dit wordt bekomen door functie ϕ af te leiden naar zijn onbekenden en deze gelijk te stellen aan nul. Zo verkrijgt men normaalvergelijkingen waaruit de beste waarde voor de onbekenden gevonden wordt voor de gegeven data.

Voorbeeld: Er is een aanwijzing dat de gegeven datapunten (x_i, y_i) (met $i = 1, \dots, n$) verspreid liggen rondom een rechte. Men is dus op zoek naar een rechte $\hat{y} = ax + b$, d.w.z. de parameters a en b worden gezocht. Nu moet men de functie $\phi(a, b) = \sum_{k=1}^n (y_k - \hat{y})^2 = \sum_{k=1}^n (y_k - (ax_k + b))^2$ minimaliseren.

$$\frac{\partial \phi}{\partial a} = \sum_{k=1}^n (y_k - (ax_k + b))^2 \cdot (-x_k) = 0$$

$$\frac{\partial \phi}{\partial b} = \sum_{k=1}^n (y_k - (ax_k + b))^2 = 0$$

Dit geeft de normaalvergelijkingen:

$$a \sum_{k=1}^n x_k^2 + b \sum_{k=1}^n x_k = \sum_{k=1}^n y_k x_k$$

$$a \sum_{k=1}^n x_k + nb = \sum_{k=1}^n y_k$$

Hieruit haalt men de waarden van a en b zodat de rechte het beste aan de data fit:

$$b = \frac{\sum_{k=1}^n y_k - a \sum_{k=1}^n x_k}{n} = \bar{y}_n - a \bar{x}_n$$

$$a = \frac{\sum_{k=1}^n y_k x_k - b \sum_{k=1}^n x_k}{\sum_{k=1}^n x_k^2} = \frac{\sum_{k=1}^n y_k x_k - (\bar{y}_n - a \bar{x}_n) \sum_{k=1}^n x_k}{\sum_{k=1}^n x_k^2}$$

$$\Rightarrow a = \frac{\sum_{k=1}^n y_k x_k - \frac{1}{n} (\sum_{k=1}^n y_k) (\sum_{k=1}^n x_k)}{\sum_{k=1}^n x_k^2 - \frac{1}{n} (\sum_{k=1}^n x_k)^2}$$

5.2 Toegepast voor het model

In het model is er een onbekende parameter Λ . Om de waarde van de parameter te bepalen waarvoor het model het beste aan de gegeven data fit, werd nu ook gekeken naar de som van de kwadraten van de residuen. Er werden verschillende waarden geprobeerd en uiteindelijk werd de waarde waarvoor de som het kleinst is gekozen.

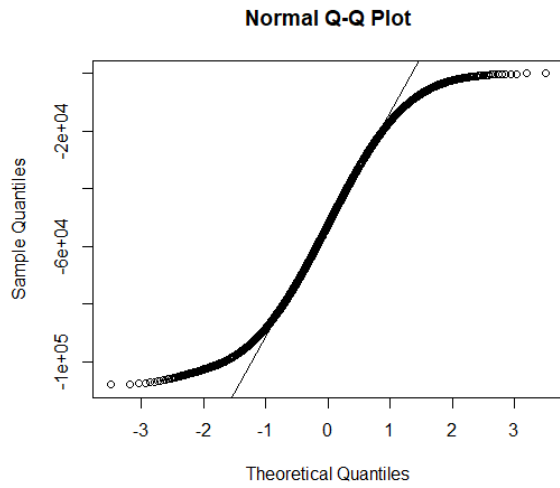
Aanvankelijk werd gedacht gebruik te maken van het Akaike informatie criterium (AIC). Hierbij berekent men een score die men minimaal wil:

$$AIC = 2K - 2 \ln(\mathcal{L}(\hat{\theta}_{MLE}; x))$$

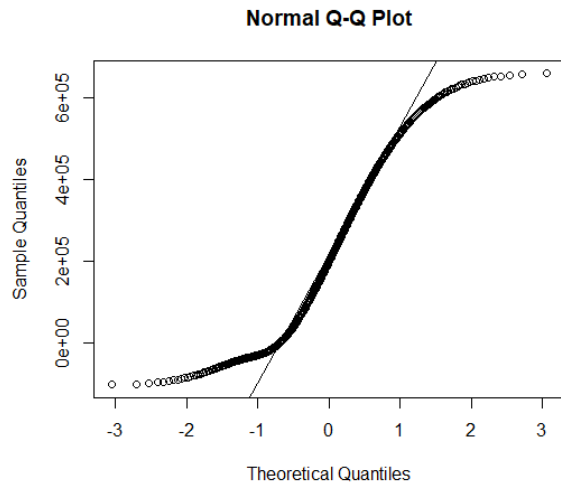
K is het aantal parameters dat men bepaalt. $\mathcal{L}(\theta; x)$ is de likelihoodfunctie, i.e. de waarschijnlijkheid dat men de gegeven data verkrijgt in functie van de parameters. $\hat{\theta}_{MLE} = \operatorname{argmax}_{\theta \in \Theta} \mathcal{L}(\theta; x)$, dit is de best mogelijke schatting voor de parameter zodanig dat de waarschijnlijkheid dat men de gegeven data x verkrijgt maximaal is.

Als de residuen normaal en onafhankelijk verdeeld zijn met verwachtingswaarde gelijk aan 0, geeft de kleinste kwadraten methode dezelfde schatting voor de parameter als de maximale likelihood schatting. Dit was niet helemaal het geval. Er werden QQ-plots gemaakt (figuren 16, 17, 18 en 19) om te kijken of de residuen normaal verdeeld waren. Voor het SEIR(Z) model lagen zowel voor 'terrestrial' als 'riparian' het grootste aantal residupunten wel op de normale verdelingslijn, maar de staarten voldeden niet. Voor het stijgende deel in SEIS(Z) model zijn de staarten heel erg groot en het dalende deel is zeker niet normaal verdeeld. Met de maximale likelihood methode zou dus een andere waarde gevonden zijn voor de parameter.

Toch werd uiteindelijk gekozen voor de kleinste kwadraten methode, omdat deze eenvoudiger geacht werd om toe te passen in dit specifieke geval en wel mooie resultaten gaf.

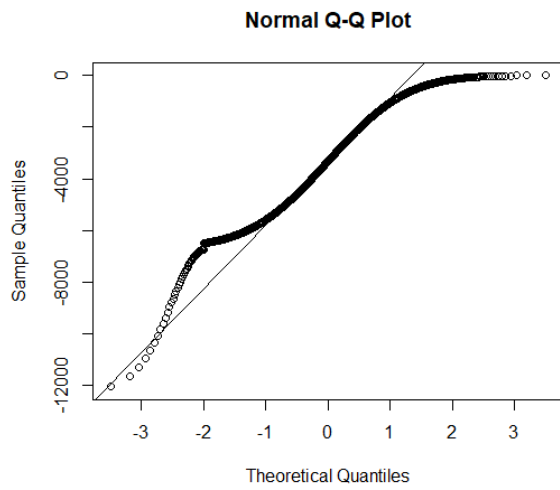


(a) stijgend

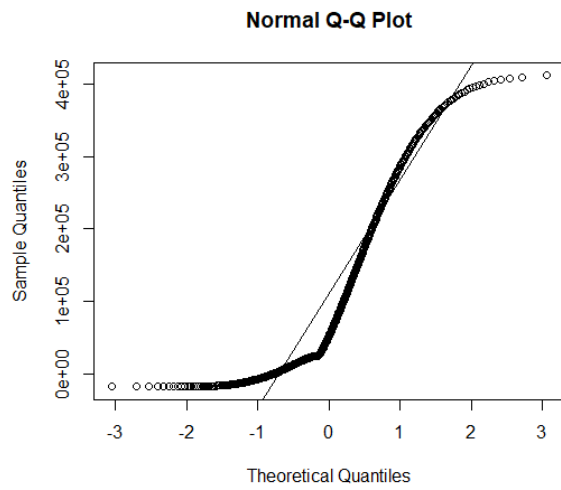


(b) dalend

Figuur 16: 'riparian' SEIR(Z) model.

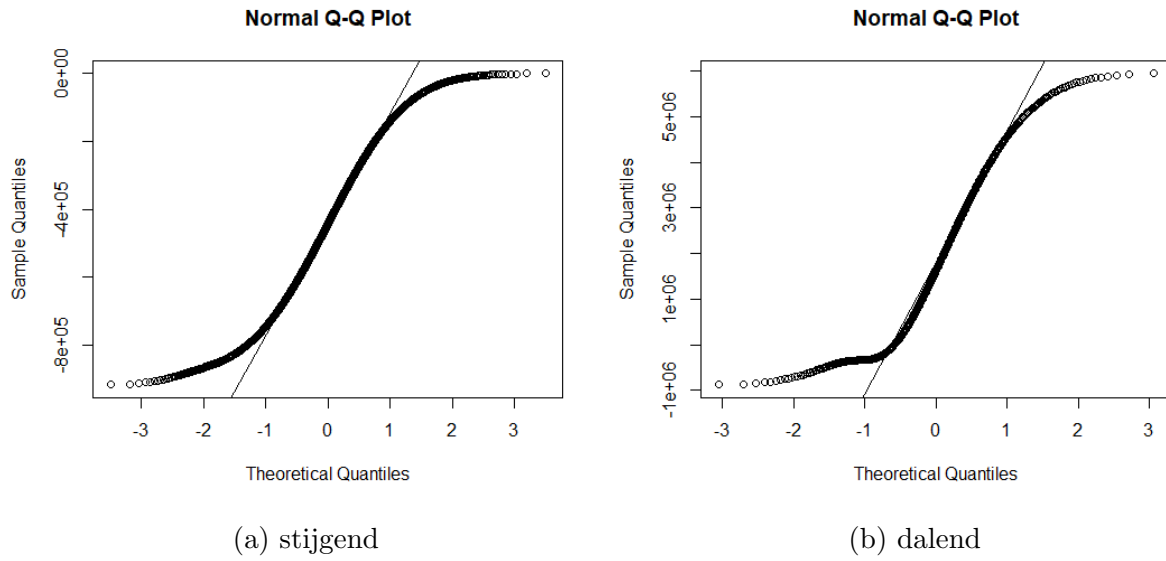


(a) stijgend

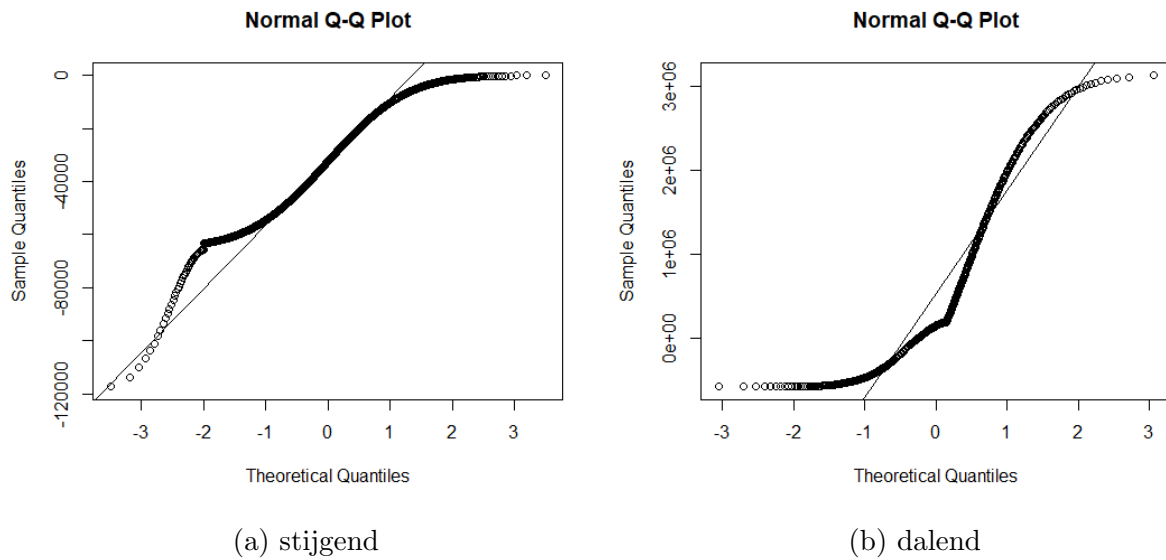


(b) dalend

Figuur 17: 'riparian' SEIS(Z) model.



Figuur 18: 'terrestrial' SEIR(Z) model.



Figuur 19: 'terrestrial' SEIS(Z) model.

6 Mitigatie

6.1 Mitigatiemaatregelen

In dit deel worden aan de hand van het opgestelde model bepaalde maatregelen omtrent de verspreiding van de ziekte geëvalueerd. Hierbij wordt het praktisch belang van het model getest. Mitigatie voor de snel verspreidende en virulente infectieziekte chytridiomycosis is dan ook cruciaal in conservatie van amfibieën in natuurgebieden. Drie

maatregelen worden steeds weer aangehaald in de literatuur als belangrijkste en meest haalbare oplossingen voor het bestrijden van Bd.

Ten eerste wordt er geopperd om de densiteit van de gastheer te verkleinen in een door Bd getroffen gebied (Woodhams et al., 2011; Scheele et al., 2014). De verspreiding van Bd is afhankelijk van de densiteit van de gastheer (Rachowicz en Briggs, 2007). Door het verwijderen of verplaatsen van individuen uit de populatie kan de snelheid waarmee de ziekte zich verspreidt worden ingeperkt (Woodhams et al., 2011).

Als toepassing op het model zou dit concreet betekenen dat de startpopulatie wordt verkleind. Dit was door praktische redenen niet mogelijk. De reden waarom er niet werd getracht de densiteiten te verlagen was omdat het model intern werkt met compartimenten tussen 0 en 1. Het resultaat wordt vervolgens herschaald naar de originele populatiegrootte. Dit maakt dat het aanpassen van de startpopulatie geen verandering teweegbrengt aan de werking van het model.

Ten tweede kan gekozen worden voor een individuele aanpak. Zo kan er aan vaccinatie worden gedaan om zo een immuunrespons op te wekken tegen minder virulente stammen van Bd in het individu (Woodhams et al., 2011). In de praktijk gaat het dan om het vaccineren van een minimum aantal individuen, zodanig dat verspreiding van Bd erg onwaarschijnlijk is. Hierdoor wordt verdere ziekte-ontwikkeling onderdrukt of wordt een infectie voorkomen (Woodhams et al., 2011).

In het SEIS(Z) model zou dit concreet betekenen dat er een 'recovered' (R) of een 'vaccinated' (V) compartiment zou worden toegevoegd, waardoor het model equivalent zou zijn aan het SEIR(Z) model. De resultaten van het gebruik van het SEIR(Z) model worden eerder in deze paper besproken en hebben voornamelijk als gevolg dat de populatie zich na een bepaalde tijd herstelt van de ziekte. Het SEIR(Z) model is cruciaal in het modelleren van vaccinatie in populaties (d'Onofrio, 2002).

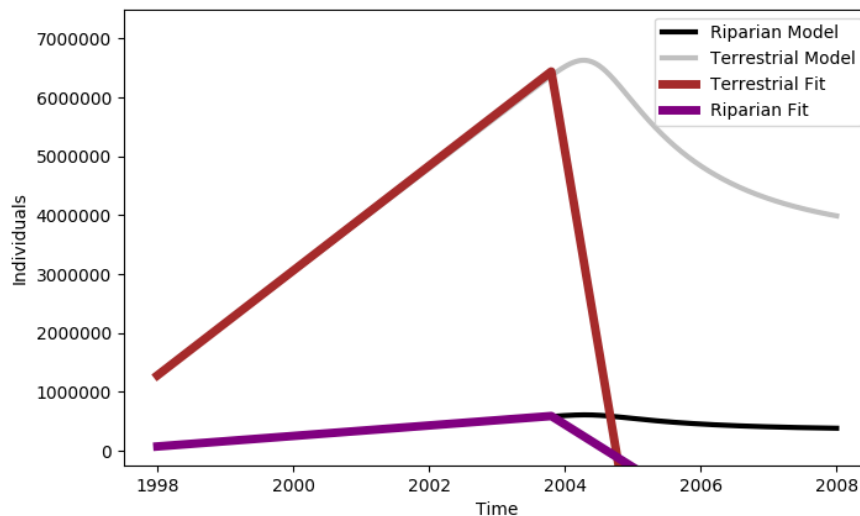
Ten derde kan er gebruik worden gemaakt van natuurlijke predatoren van Bd die ervoor zorgen dat de densiteiten van Bd in het water beperkt blijven. Dit is de zogenaamde biocontrole (Woodhams et al., 2011). Microcrustacea-zooplankton, zoals watervlooien (Cladocera), copepoden (Copepoda) en eenoogkreeftjes (Ostracoda), zijn aquatische predatoren van vele Chytridiomycota (Woodhams et al., 2011; Garner et al., 2016). Zo worden de densiteiten van de zoösporen in poelen sterk verminderd als gevolg van de aanwezigheid van deze predatoren (Woodhams et al., 2011). Het is dan ook van cruciaal belang om de ecologische omstandigheden van een waterpoel zodanig te houden dat de diversiteit en abundantie van dergelijke microcrustacea-zooplankton behoud blijven. Belangrijk hierbij is het tegengaan van eutrofiëring van het water en daarnaast de introductie van (exotische) soorten (Knapp en Sarnelle, 2008). Vooral de introductie van vissen in waterpoelen zorgt ervoor dat er overmatige predatie plaatsvindt. Hierdoor wordt het zooplankton grotendeels opgegeten (Knapp en Sarnelle, 2008; Woodhams et al., 2011). In het model kan de mortaliteit μ van de zoösporen worden verhoogt, zodanig het effect van deze maatregel kan worden geëvalueerd.

6.2 Evalueren van mitigatiemaatregelen met model

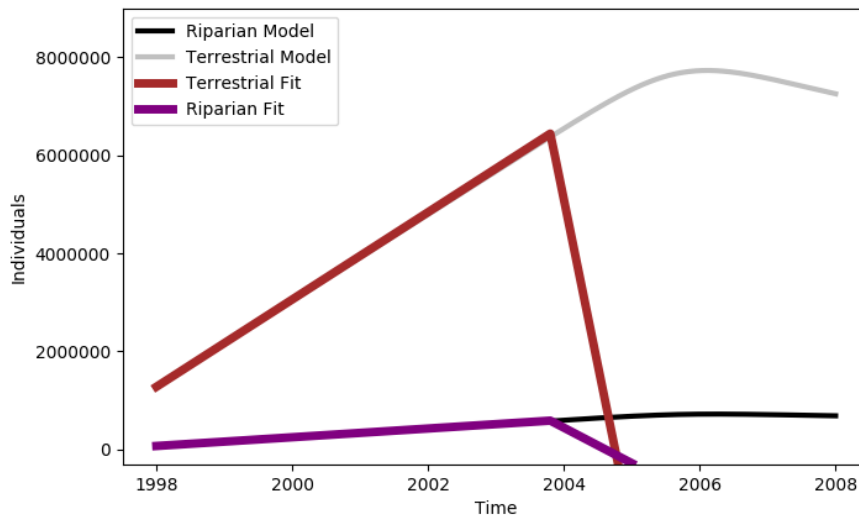
Er werd uiteindelijk wegens praktische redenen enkel gekozen voor het toepassen van het model op de biocontrole (zie 6.1).

Om de biocontrole te modelleren wordt de mortaliteit μ van de zoösporen in het water verhoogd. Normaal gezien bedraagt μ 10 eenheden, en hoort deze tussen 1 en 365 eenheden te liggen. Om de impact van de biocontrole te testen werden $\mu = 120$ (figuur 20) en $\mu = 365$ (figuur 21) gekozen als parameters. De resulterende modellen werden geplot en vervolgens visueel geëvalueerd. De impact van de maatregel was duidelijk zichtbaar. Voor $\mu = 120$ was er een sterke reductie in populatieafname voor 'riparian', en voor $\mu = 365$ werd de ziekte zo goed als tenietgedaan.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat biocontrole van groot belang is bij de bestrijding van Bd. Biocontrole kan dan ook enkel worden toegepast indien de ideale ecologische omstandigheden worden gevrijwaard in natuurgebieden (meer bepaald vijvers en waterrijke biotopen) door de bestrijding van geïntroduceerde species die op het zooplankton prederen en zo de voedselketen ontwrichten, en daarnaast het beperken van een overmatige toevoer aan nutriënten (eutrofiëring) in de waterpoelen.



Figuur 20: SEIS(Z) model met $\mu = 120$.



Figuur 21: SEIS(Z) model met $\mu = 365$.

7 Taakverdeling

Er werd op drie momenten afgesproken om samen met de begeleider Charlie Beirnaert te bespreken hoe dit project aangepakt moest worden.

1. bespreken wat het onderwerp van het project is en wat het meest haalbaar is om te doen
2. beslissen welke dataset gebruikt ging worden en bedenken hoe het model moest worden opgesteld en hoe het model moest worden geïmplementeerd
3. evaluatiemoment en hoe het model verder verfijnen
4. daarnaast is er nog 1 keer buiten de lessen afgesproken om het project verder te bespreken (zonder de begeleider)

Lotte Leys heeft zich vooral gefocust op welke mathematische methode het meest geschikt was om de onbekende parameters te schatten. Voor datatransformatie heeft Lotte het eerste gedeelte gedaan, waarbij de densiteiten werden omgezet naar aantal dieren per oppervlakte. Kasper Engelen heeft het model opgesteld, namelijk het SEIR(Z) model en het SEIS(Z) model. Daarnaast heeft hij het tweede deel van de datatransformatie gedaan, waarbij de transformaties in Python werden gezet. William Verbiest heeft de biologische achtergrondinformatie (over Bd, de modellen en mitigatie) en de parameterwaarden voor de modellen in de literatuur opgezocht. We kunnen alledrie stellen dat de communicatie en de samenwerking vlot verliep en dat iedereen heeft bijgedragen aan het doen werken van dit model.

Graag willen we onze begeleider Charlie Beirnaert bedanken voor de goede begeleiding.

8 Referenties

- Al-Shorbaji, F. N., Gozlan, R. E., Roche, B., Robert Britton, J., Andreou, D. (2015). The alternate role of direct and environmental transmission in fungal infectious disease in wildlife: threats for biodiversity conservation. *Scientific Reports* **5**.
- ArcGIS (2019). Hidrological Network of Panama. Geraadpleegd op mei, 7, 2019 van <https://www.arcgis.com/home/webmap/viewer.html?webmap=f8aab1e6382147d7b35\ad60968824229>.
- Cashins, S. D., Grogan, L. F., McFadden, M., Hunter, D., Harlow, P. S., Berger, L., Collins, J. P., Storfer, A. (2003). Global Amphibian Declines: Sorting the Hypotheses. *Diversity and Distributions* **9**, 8998.
- De Paula, C. D. en Catão-Dias, J. L. (2011). Chytridiomycosis: a Devastating Emerging Fungal Disease of Amphibians. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* **4**, 250-258.
- d' Onofrio, A. (2002). Stability properties of pulse vaccination strategy in SEIR epidemic model. *Mathematical Biosciences* **179**, 57-72.
- Duellman, W. E. (1999). Global distribution of amphibians: Patterns, conservation, and future challenges. In W. E. Duellman (Ed.): Patterns of distribution of amphibians: A global perspective, p. 1-30. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Earn, D. J. (2000). A Simple Model for Complex Dynamical Transitions in Epidemics. *Science* **287**, 667-670.
- Garner, T. W. J., Schmidt, B. R., Martel, A., Pasmans, F., Muths, E., Cunningham, A. A., Weldon, C., Fisher, M. C., Bosch, J. (2016). Mitigating amphibian chytridiomycosis in nature. *Phil. Trans. R. Soc. B* **371**, 20160207.
- Johnson, L. R. en Briggs, C. J. (2011). Parameter inference for an individual based model of chytridiomycosis in frogs. *Journal of Theoretical Biology* **277**, 90-98.
- Knapp, R. A. en Sarnelle, O. (2008). Recovery after local extinction: factors affecting re-establishment of alpine lake zooplankton. *Ecological Applications* **18**, 1850-1859.
- Lips, K. R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J. D., Alford, R. A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A. P., Collins, J. P. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *PNAS* **103**, 3165-3170.
- Longcore, J. E., Pessier, A. P., Nichols, D. K. (1999). Batrachochytrium Dendrobatidis gen. et sp. nov., a Chytrid Pathogenic to Amphibians. *Mycologia* **91**, 219.
- Marantelli, G., Skerratt, L. F., Driscoll, D. A. (2014). Interventions for Reducing Extinction Risk in Chytridiomycosis-Threatened Amphibians. *Conservation Biology* **28**, 1195-1205.
- Mitchell, K. M., Churcher, T. S., Garner, T. W. J., Fisher, M. C. (2008). Persistence of the emerging pathogen Batrachochytrium dendrobatidis outside the amphibian host greatly increases the probability of host extinction. *Proc. R. Soc. B* **275**, 329-334.
- Olson, D. H., Aanensen, D. M., Ronnenberg, K. L., Powell, C. I., Walker, S. F., Bielby, J., Garner, T. W. J., Weaver, G., The Bd Mapping Group, Fisher, M. C. (2013). Mapping the Global Emergence of Batrachochytrium dendrobatidis, the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS One* **8**, e56802.
- Johnson, M. L. en Speare, R. (2005). Possible modes of dissemination of the amp-

- hibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of Aquatic Organisms* **65**, 181-186.
- O'Hanlon, S. J. et al.** (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science* **360**, 621–627.
- Pessier, A. P.** (2014). Chapter 22: Chytridiomycosis. In *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery* (p. 255-270). New York, NY: Saunders.
- Piotrowski J. S., Annis S. L., Longcore J. E.** (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* **96**, 9-15.
- Powell, L. A. en Gale G. A.** (2015). Estimation of Parameters for Animal Populations. Geraadpleegd op 24 april, 2019 via <https://books.google.be/books?id=5a9kCgAAQBAJ&pg=PA39&lpg=PA39&dq=parameter+estimation+AIC>.
- Rachowicz, L. J. en Briggs, C. J.** (2007). Quantifying the disease transmission function: effects of density on *Batrachochytrium dendrobatidis* transmission in the mountain yellow-legged frog *Rana muscosa*. *Journal of Animal Ecology* **76**, 711–721.
- Ramsey, J. P., Reinert, L. K., Harper, L. K., Woodhams, D. C., Rollins-Smith, L. A.** (2010). Immune Defenses against *Batrachochytrium dendrobatidis*, a Fungus Linked to Global Amphibian Declines, in the South African Clawed Frog, *Xenopus laevis*. *Infection and Immunity*. **78**, 3981–3992.
- Ribas, L. et al.** (2009). Expression Profiling the Temperature-Dependent Amphibian Response to Infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE* **4**, e8408.
- Rowley, J. en Alford, R.** (2007). Behaviour of Australian rainforest stream frogs may affect the transmission of chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms* **77**, 1–9.
- Scheele, B. C., Hunter, D. A., Grogan, L. F., Berger, L., Kolby, J. E., McFadden, M. S., Skerratt, L. F.** (2013). Prior Infection Does Not Improve Survival against the Amphibian Disease Chytridiomycosis. *PLoS ONE* **8**, e56747.
- Stockwell, M. P., Clulow, J., Mahony, M. J.** (2010). Host species determines whether infection load increases beyond disease-causing thresholds following exposure to the amphibian chytrid fungus. *Animal Conservation* **13**, 62–71.
- Vazquez, V. M., Rothermel, B. B., Pessier, A. P.** (2009). Experimental infection of North American plethodontid salamanders with the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* **84**, 10.3354/dao02026.
- Voyles, J., Johnson, L. R., Briggs, C. J., Cashins, S. D., Alford, R. A., Berger, L., Skerratt, L. F., Speare, R., Rosenblum, E. B.** (2012). Temperature alters reproductive life history patterns in *Batrachochytrium dendrobatidis*, a lethal pathogen associated with the global loss of amphibians. *Ecology and Evolution* **2**, 2241-2249.
- Voyles, J. et al.** (2009). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. *Science* **326**, 582–585.
- Verdonck, T.** (2019) Wiskundige statistiek. Universiteit Antwerpen, Campus Middelheim, Departement Wiskunde en Informatica.
- Weldon, C., du Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., Speare, R.** (2004). Origin of the Amphibian Chytrid Fungus. *Emerging Infectious Diseases* **10**, 2100-2105.
- Woodhams, D. C. et al.** (2011). Mitigating amphibian disease: strategies to maintain wild populations and control chytridiomycosis. *Frontiers in Zoology* **8**, 8.