

CAPÍTULO 2.1.1.

INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

1. **Ámbito de aplicación**

A efectos de este capítulo, la quitridiomycosis es una enfermedad que deriva de la infección por el hongo formador de zoosporas *Batrachochytrium dendrobatidis* (Hongos, Chytridiomycota, Rhizophydiales). Las recomendaciones de este capítulo son aplicables a todas las especies de Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras, tritones y sirénidos) y de Gymnophiona (cecilias).

Todos los protocolos y reactivos descritos en este capítulo están disponibles en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Todo el muestreo, la histología, la histoquímica y las técnicas TaqMan están validados (Hyatt *et al.*, 2007).

2. **Información sobre la enfermedad**

2.1. **Factores del agente**

2.1.1. **El agente patógeno, cepas del agente**

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) fue descrito por primera vez en 1998 y 1999 (Berger *et al.*, 1998; Longcore *et al.*, 1999) y ahora es la causa aceptada de la enfermedad potencialmente mortal denominada quitridiomycosis (consúltese el plan de reducción de la amenaza en Australia contra la quitridiomycosis, que puede hallarse en <http://www.environment.gov.au/biodiversity/threatened/publications/tap/pubs/chytrid-background.pdf>). La enfermedad ha conllevado mortalidades masivas, disminuciones de población y extinciones (de hasta ocho especies en Australia) de poblaciones y especies de anfibios de todo el mundo (Fisher *et al.*, 2009). Bd ahora está reconocido por su capacidad de propagarse rápidamente por poblaciones de anfibios (Lips *et al.*, 2006; Skerratt *et al.*, 2007), causar altas mortalidades (Lips *et al.*, 2006; Scholegel *et al.* 2006) y persistir a densidades de hospedador bajas (Scholegel *et al.*, 2006; Woodhams y Alford, 2005). Bd ya ha sido identificado en todos los continentes (36 países) en que existen poblaciones de anfibios salvajes. Bd infecta a más de 350 especies de anfibios y ha intervenido en el declive de más de 200 de estas especies (Skerratt *et al.*, 2007).

La patogenia de esta enfermedad cutánea ha sido difícil de determinar, puesto que no se ha detectado ninguna alteración anatomopatológica constante en ningún órgano interno. Para explicar la causa de la muerte se han publicado dos hipótesis, mutuamente no excluyentes. La primera es que Bd libera enzimas proteolíticas u otros compuestos activos que son absorbidos por la piel permeable de la rana. La segunda sugiere que unos daños en la función cutánea dan lugar a perturbaciones del equilibrio hídrico y electrolítico (osmorregulación) o bien solo del equilibrio electrolítico, que comportan la muerte del animal (Berger *et al.*, 1998). Un informe reciente (Voyles *et al.*, 2009) presenta datos que respaldan la segunda hipótesis.

2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

Se ha establecido la hipótesis, aunque no se ha confirmado, de que Bd existe fuera de su hospedador. Se ha recuperado ADN de Bd de rocas (Lips *et al.*, 2006), y puede cultivarse Bd en condiciones de laboratorio en plumas de aves y en suelo húmedo (Johnson y Speare, 2003; 2005; Lips *et al.*, 2006). Se detectó Bd en mesocosmos de laboratorio de los cuales se habían eliminado *Rana sphenocephala* infectados por Bd.

2.1.3. **Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)**

Bd es susceptible a una gran variedad de tratamientos químicos y físicos (Phillott *et al.*, 2010). Las soluciones eficaces son las de compuestos del amonio cuaternario, cloruro de didecildimetilamonio (por ejemplo, Path X, en solución de 1/500 durante 30 segundos) o cloruro de benzalconio (por ejemplo, F10 solución de 1/500 durante 1 minuto). El hipoclorito de sodio es eficaz a concentraciones del 1% y superiores. También es eficaz la exposición a etanol al 70% y a 1 mg/ml de Virkon durante 20 segundos. Estas sustancias químicas pueden utilizarse para la desinfección en el laboratorio, para la cría de anfibios

y en el trabajo de campo. Así, por ejemplo, pueden utilizarse gasas empapadas en alcohol para desinfectar tijeras, calibradores y demás instrumental entre un animal y el siguiente. Los cultivos de Bd no sobreviven a la desecación completa, pero en la práctica la persistencia de agua en forma de gotitas permite la supervivencia de agentes patógenos durante incluso 3 horas tras el “secado” (Johnson *et al.*, 2003). El calentamiento por encima de los 37°C durante 4 horas da lugar a la muerte de esporangios. La luz ultravioleta utilizada sistemáticamente para matar bacterias, hongos y virus resulta ineficaz.

Bd puede crecer, pero no prosperar, en muchas fuentes distintas de nitrógeno (Piotrowski *et al.*, 2004) y en agua estéril de lago (Johnson y Speare, 2003; 2005; Piotrowski *et al.*, 2004). Otros hallazgos puntuales sugieren que puede sobrevivir y crecer como saprobio en ausencia de ranas. Las zoosporas permanecen móviles durante más de 24 horas, y alrededor de un 50% y de un 5% siguen móviles pasadas 18 horas y 24 horas, respectivamente (Piotrowski *et al.*, 2004).

2.1.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida de Bd tiene dos fases principales: la zoospora móvil, de vida corta y vehiculada por el agua para la dispersión, y el tallo estacionario monocéntrico que se desarrolla convirtiéndose en un zoosporangio para la amplificación asexual. Bd está adaptado a vivir en la epidermis estratificada de la piel. Los tallos viven dentro de células epidérmicas, parasitando inicialmente células que se encuentran a pocas capas de profundidad, y tienen una rapidez de desarrollo que coincide con la madurez de la célula a medida que se desplaza hacia el exterior y se queratiniza. Bd crece inicialmente en células vivas, pero los tallos completan su paso a zoosporangios en células queratinizadas superficiales muertas que carecen de orgánulos. Los tubos de descarga tienen la capacidad de confluir con la membrana celular epidérmica y disolverse y abrirse a la superficie de la célula, normalmente la superficie distal del cuerpo. La distribución de esporangios en adultos y renacuajos muestra que los Bd necesitan una dermis estratificada y queratinizada cuando aparecen en forma de parásitos (Berger *et al.*, 1998; Marantelli *et al.*, 2004). Los esporangios inmaduros también pueden crecer dentro de células más profundas que contengan pre-queratina. No se han hallado esporas en reposo resistentes.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Como se ha indicado anteriormente, Bd se ha identificado en seis continentes, en dos órdenes de anfibios, 14 familias y más de 350 especies. En conjunto, puede decirse que la mayoría de los anuros y urodeles, si no todos, son susceptibles a la infección por Bd; la morbilidad y la mortalidad varían entre especies. Prácticamente no se ha observado mortalidad en renacuajos (existe un informe que indica lo contrario [Blaustein *et al.*, 2005]) y, hasta ahora, no se ha detectado Bd viable en huevos.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Las fases susceptibles de la vida del hospedador son todas las edades, larvas, metamorfos y adultos (no los huevos).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

La susceptibilidad innata varía mucho entre especies. El microhabitat y el medio en el que habita una especie también son factores clave para la infección y la enfermedad, puesto que la virulencia disminuye a temperaturas más cálidas (>26°C).

A excepción de los huevos, Bd puede detectarse a cualquier edad, en larvas, metamorfos y adultos, y por varias técnicas – inspección visual de renacuajos, microscopía óptica, inmunohistoquímica, microscopía electrónica, microscopía inmunoelectrónica y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El órgano diana del que tomar muestras es la piel (Hyatt *et al.*, 2007). Un signo clínico observado en la quitridiomycosis es la muda excesiva de piel de la superficie epidérmica. La piel mudada a menudo procede de las superficies ventrales del abdomen, las extremidades y los pies, y suele identificarse (Berger *et al.*, 2005a; 2005b; Pessier *et al.*, 1999) por hiperqueratosis y la presencia de zoosporangios. La obtención de piel de estos lugares es una forma clara de maximizar la probabilidad de detectar Bd.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Alguna especie de anfibios son portadoras de infecciones subclínicas en la naturaleza y presentan pocos o ningún indicio de morbilidad ni mortalidad. No se sabe si estas especies son portadoras de por vida.

2.2.6. Vectores

Existen especies de anfibios que pueden actuar como reservorios de Bd sin presentar signos de infección. La capacidad de Bd de sobrevivir en el medio o en especies simpátricas le confiere la capacidad de llevar a ciertas especies a la extinción. Bd constituye un importante factor de riesgo para alrededor del 97% de los anfibios en peligro crítico de extinción (Smith *et al.*, 2006) y, como se ha indicado anteriormente, ha sido reconocido como la causa de extinción de ciertas especies de anfibios (Fisher *et al.*, 2009).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Solo se han identificado anfibios como fuentes y portadores de Bd.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La infección por Bd puede transmitirse entre animales por contacto entre ellos o con zoosporas móviles vehiculadas con el agua. Se considera que la transmisión a largas distancias tiene lugar por medios distintos del agua, como el traslado de animales durante el comercio internacional (Rowley *et al.*, 2007) y posiblemente por el movimiento de agua contaminada o suelo húmedo.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia varía en gran medida con la estación, el lugar y la especie. En poblaciones infectadas, la prevalencia suele ser de al menos el 5%, pero no es raro observar prevalencias del 90%. En zonas tropicales, se producen prevalencias altas en invierno y a altas altitudes. Pueden hallarse detalles sobre esta prevalencia, obtenidos mediante una intensa vigilancia global (mediante qPCR) en <http://www.spatialepidemiology.net/bd-maps/>.

2.3.3. Distribución geográfica

Se han notificado infecciones por Bd en todos los continentes (como se ha indicado anteriormente). La información de la que se dispone hasta la fecha (los países, las zonas y las especies – número analizado, positivos/negativos, método de identificación, año de notificación, el estado según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza [IUCN] y los lugares se detallan en <http://www.spatialepidemiology.net/bd-maps/>). En el momento de publicar este capítulo, Bd se había notificado en 72 países; consúltense las páginas web indicadas para más detalles.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Algunas especies de anfibios coexisten con Bd, mientras que otras sucumben a la enfermedad (Davidson *et al.*, 2003; Hanselmann *et al.*, 2004; Retallick *et al.*, 2004). Incluso dentro de cada especie, algunas poblaciones pueden coexistir con Bd, mientras que otras entran en declive hasta la extinción (Briggs *et al.*, 2005). Bd debe considerarse un agente patógeno muy infeccioso y potencialmente mortal que puede llevar a una especie a la extinción.

2.3.5. Factores ambientales

Los brotes de quitridiomycosis se asocian principalmente a estaciones (meses más fríos), altitudes (la mayoría de casos graves en general se restringen a poblaciones de grandes altitudes), y a hábitats de reproducción. Respecto a los últimos, los declives de poblaciones son pronunciados en especies que viven en arroyos. La gravedad del impacto de la enfermedad en la población también está correlacionada con pequeñas distribuciones de poblaciones que son menos fecundas (Williams y Hero, 1998). Nota: existen interacciones más complejas y diferencias de susceptibilidad aparentemente inherentes que actúan junto con estos “factores” identificados.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No aplicable.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Bd es susceptible a gran variedad de agentes antifúngicos y a niveles bajos de calor (>30°C) cuando se analiza *in vitro*, pero existen pocos métodos que hayan demostrado eliminar Bd de los anfibios (Berger *et al.*, 2010). Se ha comprobado que el calentamiento (a 32°C durante 5 días y a 37°C durante dos periodos

de 8 horas, con un intervalo de 24 horas entre ellos) es igual de eficaz contra la quitridiomycosis en dos especies de anfibios (Phillott *et al.*, 2010; Woodhams *et al.*, 2003). Debe comprobarse el efecto del calor y optimizarse en varias especies, y se observará que muchos anfibios de climas templados no toleran los 37°C. Aunque tanto los baños de itraconazol y (al 0,01% durante 5 minutos al día y un total de 11 días) como los de formalina/verde de malaquita parecen ser tratamientos eficaces para las ranas post-metamórficas (Forzan *et al.*, 2008; Hohreiter y Rigg 2001; Nichols y Lamirande, 2009; Parker *et al.*, 2002), estas pruebas no fueron rigurosas y se observó el problema de la toxicidad, en concreto en el caso de la formalina/verde de malaquita. No obstante, los baños de itraconazol se han utilizado mucho en programas de rescate y conservación de anfibios, y observaciones puntuales sugieren que es eficaz para adultos y subadultos. Se ha observado un tratamiento eficaz de renacuajos infectados de una especie en una prueba controlada en la que se ha utilizado itraconazol a dosis bajas (1,5 mg litro⁻¹), pero podría ir asociado a despigmentación (Garner *et al.*, 2009). Nota: la formulación hidrosoluble de itraconazol no es fácil de conseguir. Se ha documentado un tratamiento seguro y eficaz contra infecciones por Bd (en adultos y renacuajos) con voriconazol. Este tratamiento consiste en aplicar spray una vez al día durante 7 días a razón de 1,25 mg litro⁻¹ (Martel *et al.*, 2010).

2.4.3. Inmunoestimulación

No se ha comprobado.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se ha iniciado ningún programa de selección genética a favor de la resistencia; sin embargo, ciertos países están desarrollando planes nacionales para controlar la quitridiomycosis. Estos planes incluyen la implementación de protocolos de higiene para personas que traten con anfibios salvajes y en los que se reconozca que existen ciertas zonas aisladas e inmaculadas en las que habitan especies muy vulnerables que necesitan ser protegidas de Bd. Otra actividad (Genwin, 2008) consiste en establecer poblaciones cautivas de especies muy susceptibles amenazadas por olas epidémicas en progresión o ya infectadas y que estén sufriendo declives lentos pero constantes (el proyecto Arca de los Anfibios: <http://www.amphibianark.org/>).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

La presencia de especies resistentes se considera que aumenta la transmisión a especies amenazadas. Se han llevado a cabo programas de reproducción en cautividad para repoblar poblaciones salvajes de ranas en peligro de extinción.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se han comprobado.

2.4.7. Desinfección

En un artículo reciente de Phillott *et al.*, 2010 se resumen los protocolos de desinfección, con detalle de los protocolos respecto a la captura, la manipulación y el mantenimiento de anfibios salvajes; la desinfección de la piel antes y después de llevar a cabo intervenciones invasivas; el marcaje de las ranas; la desinfección de la piel, el cierre de heridas y el tratamiento de equipo accesorio (Tabla 1.1). Estos protocolos están diseñados para proporcionar medidas de higiene en el lugar, con el fin de minimizar el riesgo de transmisión de Bd entre animales. Este artículo también detalla protocolos de medidas de higiene en el momento de la entrada, la salida y entre lugares, para prevenir el aumento del riesgo de propagación de Bd a niveles superiores.

Tabla 1.1: Estrategias de desinfección adecuadas para matar Bd (Retallick *et al.*, 2004)

Aplicación	Desinfectante	Concentración	Tiempo
Desinfección de equipo quirúrgico y otro instrumental (como básculas o calibradores)	Cloruro de benzalconio	2 mg ml ⁻¹	1 minuto
	Etanol	70%	1 minuto
Desinfección de equipo y recipientes de obtención de muestras	Hipoclorito de sodio	1%	1 minuto
	Path X o compuestos del amonio cuaternario 128	Solución 1 en 500	0,5 minutos
	Trigene	Solución 1 en 5000	1 minuto

	F10	Solución 1 en 5000	1 minuto
	Virkon	2 mg ml ⁻¹	1 minuto
	Permanganato de potasio	1%	10 minutos
	Secado completo		>3 horas
	Calor	60°C	30 minutos
	Calor	37°C	8 horas
Desinfección del calzado	Hipoclorito de sodio	1%	1 minuto
	Path X o compuestos del amonio cuaternario 128	Solución 1 en 500	0,5 minutos
	Trigene	Solución 1 en 5000	1 minuto
	F10	Solución 1 en 5000	1 minuto
	Secado completo		>3 horas
Desinfección de la ropa	Lavado en caliente	60°C o más	30 minutos

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Cuando las instalaciones de animales en cautividad suponen una amenaza para las poblaciones salvajes, deben aplicarse las siguientes medidas:

- i) El agua, los residuos y otros materiales deben tratarse para matar Bd o bien deben guardarse, desecharse o trasladarse a un lugar donde no supongan una amenaza. Así, por ejemplo, las aguas infectadas pueden liberarse a alcantarillas que desemboquen directamente al medio marino.
- ii) Todos los animales vivos, incluidos los de producción, deben encerrarse de tal forma que no puedan salir al exterior.
- iii) Las personas, equipo y materiales que salgan de la instalación deben pasar por una limpieza suficiente como para prevenir la transmisión de Bd.
- iv) Los anfibios que sean liberados a la naturaleza deben mantenerse en estricto aislamiento y debe comprobarse si están infectados por Bd antes de liberarlos. Si alguna especie da un resultado positivo, debe tratarse, y tendrán que volver a analizarse todos los animales hasta que estén libres de la infección.
- v) Cuando se planifique la construcción de una instalación, al decidir la ubicación y el diseño deberá tenerse en cuenta el estado de la zona respecto a Bd, así como la disponibilidad de un suministro seguro de agua y de consumibles, y si los residuos podrán desecharse de forma segura. Así, por ejemplo, las operaciones de cría de animales es mejor realizarlas en zonas de tierras bajas tropicales, donde Bd no supone apenas ninguna amenaza para las especies locales y donde es más fácil acceder a medios seguros de eliminación de residuos.
- vi) Cuando en la zona haya Bd, debe tenerse cuidado de no aumentar la carga ni introducir nuevas cepas al ambiente local. Las operaciones de las explotaciones deben garantizar que la carga en el agua residual y otros materiales se reducirá a los niveles ambientales antes de ser desechada al medio, y que los animales que acaben de llegar y que puedan ser portadores de nuevas cepas serán tratados y lavados antes de instalarlos con otros anfibios.

Cuando existan fuentes externas que representen una amenaza para las poblaciones cautivas, deberán aplicarse las siguientes medidas:

- i) El agua y las personas u otros elementos que entren en la instalación deberán ser tratados para eliminar Bd, a no ser que se sepa que proceden de zonas seguras.
- ii) Los anfibios que entren en la instalación deberán aislarse y analizarse. Si alguno da positivo, deberá tratarse y se tendrá que volver a analizar todo el grupo hasta que se observe que está libre de infección.

3. Obtención de muestras

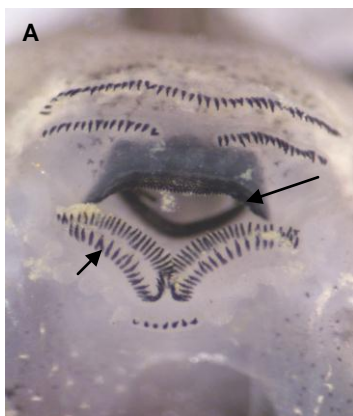
3.1. Elección de ejemplares

Bd se replica en las partes queratinizadas de los aparatos bucales de los renacuajos y en casi todas las superficies ventrales, así como en los dedos de los pies de los anfibios adultos. Los órganos infectados son los dedos de los pies (que deberían cortarse, pero no se recomienda por motivos éticos), la piel (deben tomarse hisopos) y los aparatos bucales (renacuajos), y también debe realizarse baños de animales enteros (adultos y renacuajos) (Hyatt *et al.*, 2007).

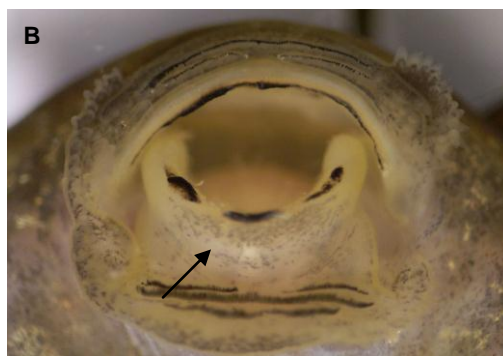
3.1.1. Corte de dedos de los pies (adultos), discos orales (renacuajos/larvas), e hisopos (adultos y renacuajos)

Los dedos de los pies que vayan a ser utilizados en PCR TaqMan en tiempo real deberán cortarse en el campo y guardarse secos o en alcohol al 70%. Como alternativa, se pueden recoger en tubos de 1,5 ml y guardarse a -80°C hasta que se realice la extracción de ADN. Los dedos de los pies que vayan a ser procesados para histología deben fijarse en formalina tamponada neutra al 10%.

En el campo, pueden obtenerse hisopos de los aparatos bucales de renacuajos (discos orales – véanse las fotografías siguientes) utilizando hisopos de punta fina¹. Estos discos orales también se pueden extirpar y secar al aire sobre papel de filtro. Pueden reconocerse los animales infectados por la despigmentación (flecha, fotografía B) de la capa dérmica de la mandíbula, la presencia de dientes acortados o la pérdida de dientes (Imágenes cedidas por el Dr. Obendorf; Departamento de Anatomopatología, Universidad de Tasmania).



Disco oral normal (tejidos pigmentados) de *Crinia signifera*



Ejemplar de *Limnodynastes dumerilii* afectado por Bd

Al tomar hisopos de ranas, debe asegurarse la muestra de la cara inferior de las extremidades, los pies y el parche pélvico (pasando el hisopo 3-5 veces); a continuación debe romperse el palo del hisopo y la parte húmeda debe depositarse en un tubo de 1,5 ml. Debe tomarse un hisopo de los aparatos bucales de renacuajos insertando el hisopo en la boca y haciéndolo girar varias veces.

3.1.2. Baños de agua y filtros

Dado que la piel de las ranas infectadas se desprende quedando en el medio que la rodea, pueden colocarse anfibios en recipientes que contengan soluciones sin Bd (como la solución DS; se describe más adelante). El agua del “baño” puede analizarse directamente (consúltese abajo) tras una inmersión de 15 minutos. Como alternativa, puede filtrarse el agua del baño y guardar los filtros (por ejemplo, filtros de 0,45 μm^2) secos (a temperatura ambiente o a 4°C) hasta que sean analizados.

Reactivos

Preparación de solución salina débil (DS)

KH_2PO_4 – 0,001 M

1 Medical Wire & Equipment Co. MW100-100.
2 Sartorius Minisart No. 16555.

MgCl₂ – 0,0001 M
CaCl₂ – 0,00002 M

Solución madre #1 (solución de fosfato):

KH₂PO₄ – 136,0 g

K₂HPO₄ – 174,18 g

(NH₄)₂HPO₄ – 132,07 g

Agua destilada hasta 1000 ml

Solución madre #2 (solución de calcio-magnesio):

CaCl₂.2H₂O – 36,76 g

MgCl₂.6H₂O – 50,83 mg

Agua destilada hasta 500 ml

Se lleva el pH a 7 con KOH (solución débil)

Para crear la DS, se añaden 0,1 ml de la solución madre de calcio-magnesio y 0,5 ml de la solución de fosfato a 1000 ml de agua destilada.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Los hisopos y los discos orales extirpados pueden guardarse secos a temperatura ambiente (de hasta 23°C). Nota: la exposición a temperaturas altas durante largos periodos de tiempo (por ejemplo, en un coche) puede reducir la obtención de ácido nucleico.

En caso de realizar el examen mediante microscopía óptica o electrónica, se fijan los tejidos en formalina tamponada neutra al 10% y glutaraldehído tamponado al 2,5%. Las muestras deben procesarse como se describe para la Necrosis hematopoyética epizootica o la Infección por ranavirus.

3.3. Combinación de varias muestras

Pueden juntarse un máximo de cinco muestras (aunque las débilmente positivas pueden obviarse). Nota: se recomienda juntar las muestras solo en los estudios de población cuyo objetivo sea obtener datos de presencia/ausencia (Hyatt *et al.*, 2007).

3.4. Órganos y tejidos de elección

Piel ventral (adultos), dedos de los pies (adultos) y aparatos bucales (renacuajos).

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Órganos internos y huevos.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

En la mayoría de los animales infectados no se observan signos clínicos. El periodo de manifestación de signos clínicos suele ser corto y se limita a los anfibios que después morirán.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Predominan los signos del sistema nervioso central. Las alteraciones del comportamiento consisten en un movimiento lento y descoordinado, posturas de sedestación anómalas, espasmos tetánicos, pérdida del reflejo de erguido y parálisis.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Pueden observarse alteraciones macroscópicas de la piel en las infecciones graves, que consisten en una muda anómala de la piel (más frecuente de lo normal y en trozos más pequeños) y eritema. Estos signos clínicos no son específicos de la quitridiomycosis.

4.2.2. Bioquímica clínica

En la rana arborícola verde de Australia enferma (*Litoria caerulea*) se observan reducciones en las concentraciones plasmáticas de sodio y de potasio de un 20% y un 50%, respectivamente (Voyles *et al.*, 2009).

4.2.3. Anatomopatología microscópica

La microscopía consiste en el examen de preparaciones húmedas de piel (raspados, frotis o piel entera), cortes histológicos de piel teñido con hematoxilina y eosina, e inmunohistoquímica de cortes de piel. Estas pruebas sistemáticas tienen un alto valor predictivo positivo. A continuación se explican detalles de estas técnicas y sobre cómo interpretar los resultados.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Pueden examinarse muestras de piel entera, de las membranas interdigitales o de cualquier otro lugar; esta técnica mantiene la anatomía de la piel y permite examinar una gran superficie. La ventaja es que la muestra se puede orientar y que la localización del agente sospechoso puede ayudar a identificarlo. Así, por ejemplo, puede determinarse si en las células superficiales hay perfiles fúngicos sospechosos, lo cual sería indicativo de Bd, o bien si se encuentran en capas más profundas, lo cual es normal en la morfología normal del anfibio. Esta técnica es rápida, barata y, cuando es utilizada por observadores con experiencia, ofrece una sensibilidad equivalente a la de la tinción con hematoxilina y eosina (Longcore *et al.*, 2007). Es útil para estudiar ranas sanas de las que no puedan obtenerse hojas de piel mudada.

Los renacuajos infectados a menudo pueden identificarse en el campo por la falta de color en las capas dérmicas de las mandíbulas, lo cual puede observarse mediante lupas (x10). Los aparatos bucales del renacuajo también se pueden examinar cortando trozos de las filas de dientes o de las capas dérmicas y aplastándolos bajo un cubreobjetos, donde se podrán observar agrupaciones de esporangios.

En las preparaciones húmedas y los frotis (véase abajo), normalmente se observan esporangios intracelulares de forma entre redonda y ovalada formando agrupaciones. En piel mudada el estadio más frecuente es el de esporangios vacíos viejos, aunque también es frecuente hallar esporangios que contengan zoosporas. Los tubos de descarga (asociados a los zoosporangios), de los cuales salen zoosporas, suelen apuntar perpendicularmente a la superficie de la piel y, por tanto, son pequeños círculos, tal vez difíciles de diferenciar. La observación de septos internos dentro de los esporangios aumenta la confianza en el diagnóstico. Los núcleos de las células de la epidermis son de tamaño similar al de los esporangios, pero pueden diferenciarse por sus membranas irregulares y poco definidas, y por su aspecto plano, granular y gris.

4.2.5. Frotis

El examen de raspados o frotis de piel mediante microscopía óptica es un método rápida y sencillo de identificar Bd y puede realizarse con muestras frescas, congeladas o fijadas (Berger *et al.*, 2009a). La piel mudada se levanta o se raspa en la rana (mediante una hoja de bisturí o una espátula de plástico estéril) y se extiende sobre un porta con una gota de agua, se cubre con un cubreobjetos y se examina la preparación con un microscópico óptico compuesto. Teóricamente se obtiene una monocapa uniforme de células epidérmicas queratinizadas. Se utilizan el objetivo de 100 aumentos inicialmente para examinar una zona y a continuación el de 400 para confirmar la presencia de esporangios. Los esporangios (5-13 µm) intracelulares, de forma entre redonda y ovalada, forman agrupaciones en el interior de las células hospedadora. Los esporangios vacíos viejos son el estadio más prevalente en la piel mudada, aunque es frecuente observar esporangios que contengan zoosporas.

Las muestras preparadas como se ha descrito anteriormente pueden teñirse mediante los siguientes protocolos:

Azul algodón de lactofenol:

- i) Se instila una gota de alcohol al 70% sobre un porta.
- ii) Se sumerge la muestra/material en la gota de alcohol.
- iii) Se añaden una o dos gotas de azul algodón de lactofenol antes de que el alcohol se seque.
- iv) Sosteniendo el cubre entre el dedo índice y el pulgar, se toca un borde de la gota de medio de montaje con el borde del cubre, y se baja con cuidado, evitando formar burbujas de aire. Ahora la preparación está lista para ser examinada.

Reactivos (se prepara 1 litro):

Fenol:	200,0 g
Azul algodón:	0,5 g
Glicerol:	400 ml
Ácido láctico:	200 ml
Agua desionizada:	200 ml

Rojo Congo: Con una solución de trabajo de Rojo Congo acabada de preparar (y filtrada), se tiñen raspados o frotis de piel durante 45-60 minutos. Las paredes quitinosas de esporangios vacíos (paredes) y los tubos de secreción expuestos se teñirán de color rojo ladrillo. Las paredes de los esporangios más inmaduros, los maduros y los vacíos también se teñirán. Nota: con este procedimiento, las zoosporas no se tiñen. Los núcleos de las células epidérmicas se tiñen de color naranja claro con el Rojo Congo si las células están dañadas.

Reactivos

Solución madre:	saturada
Tinción Rojo Congo:	1,0 g
Solución madre de NaCl:	500 ml
(Solución madre de NaCl 30,0 g + 200 ml de agua destilada)	200 ml

Solución de trabajo (Rojo Congo)	
Solución madre de Rojo Congo:	50,0 ml
NaOH al 1%:	0,5 ml

Nota: Se filtra por lana de fibra de vidrio, y la solución debe ser transparente, no turbia; debe utilizarse de inmediato)

Puede utilizarse DipQuick³ para teñir para citología diagnóstica general. Para la detección de Bd, se utiliza la tinción para identificar zoosporas y paredes de esporangios; el citoplasma y los núcleos de la célula hospedadora también se teñirán. Se trata de una tinción comercial y debe seguirse el protocolo del fabricante.

Nota: estas tinciones pueden mejorar la exactitud y la facilidad del diagnóstico, pero no se han realizado comparaciones.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos distintos de las preparaciones húmedas y de los frotis

4.3.1.1.1. Microscopía óptica: cortes fijados

Se preparan los tejidos igual que para los protocolos convencionales. Se tiñen cortes de 5 µm de espesor con hematoxilina y eosina (Drury y Wallington, 1980). Se corta de tal forma que se consiga un corte vertical de la piel.

Los dedos se examinan cortando la cara ventral entera de una piel o cortando un dedo. En el caso de los dedos de los pies, la longitud máxima de estrato córneo se consigue a partir de un corte longitudinal y no de un corte transversal. Los dedos se descalcifican en EDTA durante 48 horas a 37°C o en ácido fórmico al 10% durante 3-5 días antes del procesado. Como alternativa, en el caso de los dedos más grandes, por ejemplo de anfibios con una longitud de hocico de más de 60 mm, se puede retirar la piel de la falange subyacente y cortar la piel sin hueso.

En el estrato córneo, el quitridio es esférico u ovalado con papilas de secreción que se proyectan desde la superficie. Pueden papilas de secreción en cortes histológicos, pero no son frecuentes. Las zoosporas que se desarrollan en el zoosporangio salen por el tubo de secreción abierto. La pared del zoosporangio es lisa, de espesor uniforme y normalmente eosinófila. El contenido de los zoosporangios varía en función de la fase de desarrollo del quitridio; se han identificado cuatro fases: (1) La primera fase contiene una masa central basófila, bastante homogénea. (2) Los zoosporangios se vuelven multinucleados y a continuación el citoplasma se divide formando zoosporas. Las zoosporas son basófilas y en el corte transversal tienen aspecto de cuerpos redondos u ovalados, y

3 http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/diff_quick_ellis.htm

se observan unos 4 a 10, en función del plano del corte. (3) Una vez las zoosporas se han liberado por las papilas de secreción, los zoosporangios quedan vacíos. En algunas fases coloniales, pueden observarse septos delgados dividiendo el esporangio en compartimientos internos. (4) El esporangio vacío puede hundirse adoptando una forma irregular. Durante esta fase terminal la estructura vacía a veces resulta colonizada por bacterias, que pueden observarse en el corte en forma de bacilos o cocos basófilos. Los esporangios vacíos son el estadio más frecuente de la capa superficial mudada. En cortes histológicos el diámetro de los zoosporangios oscila entre los 5 y los 13 μm . Tienen un tamaño similar al de los núcleos de las células epidérmicas. Los tubos de descarga tienen un diámetro de 2 μm y son de longitud variable, normalmente de entre 2 y 4 μm , pero a veces pueden medir incluso 10 μm de largo. Las zoosporas miden unos 2 μm de diámetro. La infección se suele asociar a anatomopatología cutánea y estas alteraciones pueden utilizarse para detectar, a bajos aumentos, zonas probablemente infectadas. Es frecuente una hiperqueratosis y erosiones focales en la zona adyacente a los microorganismos. Puede haber un engrosamiento irregular de la epidermis (hiperplasia). En algunos casos mortales, una extensa muda de la capa hiperqueratótica deja la epidermis con pocos microorganismos. Sin embargo, en estos casos puede detectarse Bd en bajas cantidades en la capa superficial ligeramente queratinizada o pueden observarse en grandes cantidades en la piel mudada. En zonas de gran ulceración no hay esporangios (Berger *et al.*, 2009b).

4.3.1.1.2. Microscopía electrónica

La preparación de muestras (piel y dedos de los pies) se describe en otro lugar (Berger *et al.*, 2005a). Determinados estudios sobre la piel de ranas infectadas realizados mediante microscopía electrónica muestran una zona de citoplasma hospedador condensado, de hasta 2,5 μm de grosor, alrededor de algunos esporangios. Esta zona parece estar formada principalmente por fibrillas (sin orgánulos). Las células epidérmicas más superficiales contienen esporangios más grandes, y los núcleos y orgánulos del hospedador, como las mitocondrias, están situados en un lado de la célula. Cerca de la superficie de la piel, el citoplasma epidérmico se condensa en una capa fina alrededor de los tallos fúngicos y se pierden orgánulos del hospedador, como ocurre durante la maduración normal de la célula epidérmica. Los núcleos de las células se vuelven oscuros y se condensan, pero no son tan aplanados como en el estrato córneo normal. Parece producirse queratinización de forma prematura en las células situadas debajo de la superficie de la piel, en comparación con las células infectadas de la misma capa epidérmica. Las uniones celulares de las células infectadas suelen tener un aspecto normal. Algunas células infectadas y no infectadas próximas a los focos de infección se hinchan de forma aguda, aunque las mitocondrias y otros orgánulos de estas células quedan intactos. Los núcleos de algunas células infectadas del estrato granuloso están encogidas y cromatolíticas. La anatomopatología de las células epidérmicas más profundas, en la capa basal, consiste en encogimiento, aumento de los espacios intercelulares, vacuolación y disolución del micoplasma. La hiperqueratosis parece poder atribuirse en parte a un aumento de la renovación de células epidérmicas. La hinchazón de las células epidérmicas próximas a los focos de infección sugiere una respuesta hiperplásica. Los esporangios parecen empezar a iniciar una muerte prematura y una queratinización de las células hospedadoras. Puede producirse adelgazamiento de la epidermis cuando la germinación de las células epidérmicas no puede compensar la rapidez de muda causada por el aumento de muerte celular. Otras ranas infectadas pueden tener la epidermis destacadamente engrosada debido a que la hiperplasia supera la tasa de muda.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Aislamiento, cultivo y archivo de Bd

4.3.1.2.1.1. Aislamiento

Se obtienen animales (vivos, moribundos o que acaben de morir) y se guardan refrigerados y húmedos hasta que se examinen. Se identifica Bd como se ha descrito anteriormente.

- i) Se examina la piel con un microscopio de disección ($\times 10$ o $\times 20$).
- ii) Se utiliza una aguja afilada y estéril para retirar la piel suelta de entre los dedos de los pies y de otras partes de la superficie ventral del animal. Si la piel no está suelta, se utilizan pinzas de disección y se rasgan trozos tirando del borde más grande de piel situado entre los dedos de los pies o utilizando una hoja de afeitar de un solo margen para extirpar las membranas interdigitales de los pies. En el caso de los animales larvarios, si presentan pérdida focal de dientes o despigmentación de la capa dérmica de la mandíbula, se retiran estas zonas con pinzas de disección.
- iii) Se coloca la piel o la capa dérmica de la mandíbula sobre un porta en una gota de agua destilada estéril y se cubre con un cubreobjetos. Se observa con un microscopio compuesto a $\times 100$ y $\times 400$.

- iv) Se comprueba si hay esporangios (cuerpos con pared, entre esféricos y ovalados, de 10-30 µm de diámetro) dentro de las células epidérmicas. Nota: algunos esporangios serán septados (es decir, contendrán divisiones de las paredes de la célula), en los que se dividirá el cuerpo fúngico, o tallo, en dos o más esporangios. Algunos esporangios pueden contener zoosporas y algunos estarán vacíos.
- v) Se coloca la piel en la que se haya observado Bd sobre una placa de cultivo (de 9 cm) que contenga agar nutriente mTGh con antibióticos, que se añaden tras la esterilización en autoclave.
- vi) Se utiliza una aguja afilada y esterilizada para tomar e introducir pequeños (<1x1 mm) trozos de piel infectada (x40) en el agar nutriente (placa de cultivo de 9 cm). Si los trozos de piel son demasiado gruesos y no se rasgan, se cortan en trozos pequeños con unas microtijeras o tijeras cortapieles.
- vii) Cada pocos mm se retira la aguja del rozo de piel y se pasa por el agar (para eliminar bacterias, hongos y esporas fúngicas).
- viii) Se invierte la dirección de la piel y se pasa una y otra vez por el agar. Nota: La contaminación bacteriana y fúngica no supone a penas ningún problema cuando se trabaja con tejido de renacuajo.
- ix) Tras pasar la muestra por el agar, se coloca la piel limpia sobre una placa nueva de agar mTGh. Hay que asegurarse de que la nueva placa se abra muy poco, y debe pasarse la muestra por el agar introduciéndola con la aguja. Se repite este proceso para otros trozos de piel; en cada intento, se recomienda colocar al menos seis trozos de piel limpia en cada una de un total de dos placas. Se sella la placa de agar nutriente con Parafilm® u otro material sellante de laboratorio bien ajustado alrededor de la circunferencia de la placa.
- x) Se incuban las placas a 17-23°C. Durante las siguientes una a tres semanas, se comprueba el desarrollo invirtiendo la placa de cultivo en la platina de un microscopio compuesto (x100). Se comprueba si las placas presentan contaminantes y se retiran las colonias fúngicas y bacterianas con una hoja de bisturí esterilizada. Se comprueba si hay zoosporas móviles de Bd (3–4 µm) cerca de la piel (1–3 días post-inoculación) o si hay contornos esféricos de tallos en crecimiento (normalmente en un plazo de varios días a 2 semanas). Si se observan hifas creciendo de la piel limpia, se retira de forma aséptica la colonia de hifas de la placa de aislamiento con un cuchillo/hoja de bisturí estériles.
- xi) Cuando se observan colonias de Bd en la piel, puede retirarse de forma aséptica parte de una colonia y colocarse en una gota de agua en un porta. Se observa con un microscopio compuesto y se identifican esporangios y zoosporas por comparación con fotografías publicadas (por ejemplo, las de Berger *et al.*, 2002; Longcore *et al.*, 1999; y <http://www.umaine.edu/chytrids/Batrachochytrium/Photographs.html>).
- xii) Tras una identificación positiva y crecimiento suficiente (2 semanas – 1 mes) se transfiere la colonia (o parte de la misma) de forma aséptica a una placa de agar triptona al 1%. El hongo crece mejor en grupos, de modo que hay que tener cuidado de no separar los esporangios durante la transferencia. Se incuba durante 1-2 semanas; si el cultivo está libre de microorganismos contaminantes (por ejemplo, bacterias y hongos), se esparce la colonia sobre la placa y se transfiere una parte de la colonia a un caldo nutriente en un frasco de 250 ml con tapón de rosca. Para disponer de réplicas, también deben transferirse trozos de la colonia a placas nuevas, que se sellarán con Parafilm®. Nota: si es posible, hay que trabajar en una cabina de flujo laminar.
- xiii) Para disponer de stocks, deben guardarse dos conjuntos de cultivos en triptona líquida al 1% a 5°C. Los cultivos de medio líquido refrigerados permanecen viables durante unos cuatro meses.

Reactivos

mTGh

8 g de triptona
 2 g de hidrolizado de gelatina
 10 g de agar
 1,000 ml de agua destilada

Se añaden 200 mg litro⁻¹ de penicilina-G y 200–500 mg litro⁻¹ de sulfato de estreptomina tras la esterilización en autoclave; si las bacterias siguen siendo un problema, se añade 1 mg litro⁻¹ e ciprofloxacilina.

Triptona agar al 1%

10 g de triptona

10 g de agar
1000 ml de agua destilada

Caldo tristona al 1%
10 g de triptona
1000 ml de agua destilada

4.3.1.2.1.2. Crio-archivo a partir de cultivo en caldo

4.3.1.2.1.2.1. Preparación de cultivos

- i) Se toman 2 ml del caldo de cultivo con crecimiento activo (de 1 semana).
- ii) Se añaden a 13 ml de caldo nuevo en un frasco de 25 cm².
- iii) Se incuba durante 3-4 días asegurándose de que los frascos estén planos.
- iv) Los cultivos deben tener muchas zoosporas muy activas, esporangios individuales pequeños o medianos adheridos al plástico y algunos más grandes cerca de las zoosporas que se están liberando. También debe haber muchas agrupaciones pequeñas de esporangios flotando en el caldo.
- v) Se rascan las paredes del frasco y se centrifuga el contenido en una centrífuga de sobremesa a 1700 **g** durante 10 minutos.
- vi) Se vierte el sobrenadante (hay que tener en cuenta que el sobrenadante contiene grandes cantidades de zoosporas activas).
- vii) Se vuelve a suspender el sedimento en 1 ml de DMSO al 10% y suero fetal bovino (FBS) al 10% en caldo y se congela en un recipiente para congelación. Un DMSO al 10% en caldo o crioprotector (como abajo) también funciona, pero la combinación de DMSO y FBS es la que proporciona la mejor recuperación.
- viii) Tras la descongelación y la siembra en placas de TGhL, se añade 1 ml de DS.

4.3.1.2.1.2.2. Congelación de cultivos

- i) En una cabina de flujo laminar, se añade crioprotector (más o menos 1 ml) en un tubo de 3 ml.
- ii) Se rasca una parte del cultivo de Bd y se coloca en el crioprotector. Si hay algunas zonas del cultivo con agrupaciones sólidas, se escogen unas pocas, con el agar adherido, y se añaden a la parte rascada. Nota: no se deben añadir más de unos 0,5 cm³ de cultivo.
- iii) Se congela utilizando un recipiente de congelación de plástico que contenga isopropanol⁴.
- iv) Se colocan los recipientes de congelación en un congelador a -80°C toda la noche, a continuación se colocan los tubos de congelación en nitrógeno líquido a modo de almacenaje permanente.

4.3.1.2.1.2.3. Descongelación de cultivos

- i) Se llena un recipiente con agua (43°C).
- ii) Se colocan los tubos de congelación directamente procedentes del nitrógeno líquido en esta agua y se comprueba que se mantengan bajo el agua. Se agitan durante unos 30 segundos.
- iii) Se comprueban los tubos de congelación elevándolos fuera del agua, para determinar si el crioprotector se ha descongelado. Si se ha descongelado, se vierte el contenido en una placa de Petri estéril; si no, se devuelven al agua tibia. Es fundamental que la muestra no se caliente demasiado (Nota: una exposición prolongada de Bd a 43°C matará el microorganismo). Consejo: cuando el contenido empiece a descongelarse, sostenga el tubo de congelación en la mano para que el calor de su mano facilite la descongelación.
- iv) Se coloca la muestra en el agar (TGhL) de la placa de Petri.
- v) Se pipetea algo del crioprotector líquido sobre la muestra (en la placa de Petri).
- vi) Se depositan unas pocas gotas (alrededor de 1 ml) de DS sobre la muestra transferida y se incuba (consultar arriba). Se examinan los cultivos durante 7-10 días para comprobar si

4 Se recomiendan los recipientes de Mr Frosty® (Nalgene)

hay movimiento de zoosporas. Si, pasados 4-7 días, no se observa movimiento y el agar tiene un aspecto seco, se instilan unas pocas gotas de DS sobre el cultivo. Si no se produce movimiento pasadas 3 semanas, es probable que los cultivos estén muertos.

Nota: Si hay contaminación, se transfiere el cultivo a una zona descontaminada. Si la contaminación es considerable, se utiliza TGH con antibióticos.

Reactivos

DS

Véase el apartado 3.1.2.

Medio de congelación

Solución madre de leche desnatada

Se añaden 90 ml (30,5 g) de leche desnatada en polvo a 200 ml de agua destilada a temperatura ambiente en un frasco de 500 ml. Se mezcla bien, se esteriliza en autoclave durante no más de 15 minutos con una frecuencia de ventilación de 5-8 minutos. Es importante recordar que la leche se carameliza con gran facilidad, y que a menudo hay que tirarla y volver a repetir este paso. Si la solución está demasiado marrón al sacarla del autoclave, hay que tirarla y repetir el proceso. Debe ser de color marrón claro/crema.

Solución #1: Se preparan 100 ml de glicerol al 20% en agua doblemente destilada y se esterilizan en autoclave con un ciclo normal.

Solución #2: En una campana, se prepara una solución estéril de leche desnatada al 17% (véase arriba) añadiendo 17 ml de la solución de leche desnatada a 83 ml de agua estéril.

En una campana, se preparan 200 ml de crioprotector añadiendo volúmenes iguales de solución #1 a solución #2. Esto debe mantenerse estéril, flameando el cuello de la botella al utilizarla.

4.3.1.3. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

Hay que tener en cuenta que los anticuerpos que se utilizan en todos los métodos relacionados reaccionan de forma cruzada con varios hongos (Berger *et al.*, 2002). Por tanto, deben utilizarse con cuidado y junto con microscopía óptica clásica y/o electrónica (véase el apartado 4.3.1.).

4.3.1.3.1. Co-localización de *Bd* y queratina mediante histoquímica y tinción especializada

Se procesaron cortes de animales infectados mediante una versión modificada del protocolo (Berger *et al.*, 2002). Se incubaron cortes con anticuerpo secundario conjugado a inmunoperoxidasa (IPX), lo cual dio lugar a una tinción roja-marrón de agrupaciones de *Bd* entre las células epiteliales (teñidas mediante tinción de contraste con hematoxilina de Lillie-Mayer⁵).

Procedimiento # 1: Inmunoperoxidasa

- i) Se desparafinan los cortes: 10 minutos en un horno a 60°C, xileno 1 minuto (x3), etanol al 100% (grado tec) 1 minuto x2, etanol al 70% 1 minuto, chorro de agua de grifo 1 minuto, agua destilada.
- ii) Se enjuagan en tampón PBS para eliminar las burbujas de aire.
- iii) Se aplican anticuerpos primarios a la dilución deseada (se determina empíricamente); se utiliza una solución de leche desnatada en polvo /PBSA al 1% como diluyente
- iv) Se incuban los portas 45 minutos a 37°C.
- v) Se enjuagan los portas en PBS durante 5 minutos.
- vi) Se bloquea el peróxido endógeno: Se aplica H₂O₂ al 3% en agua destilada, 200 µl/ porta, durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- vii) Se enjuagan los portas con PBS durante 5 minutos.

- viii) Se añade “Envision +”⁶ (anti-conejo cuando los anticuerpos primarios son policlonales, y anti-ratón cuando los anticuerpos primarios son monoclonales), 3-4 gotas durante 20 minutos, a 37°C.
- ix) Se enjuagan los portas con PBS durante 5 minutos.
- x) Se extraen los portas de los estuches de secuencias y se colocan en la rejilla de tinción en tarro o tampón. Se distribuyen los portas sobre una rejilla horizontal de tinción limpiando los cortes con papel absorbente y aplicando solución sustrato a razón de 200 µl por porta.
- xi) Se añaden 200 µl de dimetilformamida (DMF) a 200 mg de AEC (3-amino-9-etilcarbazol, Sigma) en polvo, asegurándose de que el polvo se disuelve por completo, se añaden 10 ml de tampón acetato 0,05 M a pH 5,0, se añaden 5 µl de H₂O₂ al 30%.
- xii) Se comprueba el corte control positivo cada 2 minutos hasta que se logra una tinción óptima, normalmente a los 2-5 minutos.
- xiii) Se detiene la reacción lavando los portas en agua destilada.
- xiv) Se aplica una tinción de contraste en hematoxilina de Lillie-Mayer (Mod.) durante 30-90 segundos, se enjuaga en agua de grifo, azul en solución de Scott, se enjuaga bajo el chorro de agua de grifo.
- xv) Se enjuagan los portas en agua destilada y se montan en medio acuoso de montaje.

Procedimiento #2. Fosfatasa alcalina y tinción de queratina

La identificación histológica e histoquímica de Bd puede complicarse cuando se muda la capa queratinizada superficial (estrato córneo), lo cual comporta un error en el diagnóstico porque los esporangios se pierden con la piel mudada. La combinación de la inmunotinción de Bd con la tinción de queratina tricrómica de Hollande ayuda a determinar si un resultado negativo puede deberse a la pérdida de la capa de queratina (Olsen *et al.*, 2004).

Aunque la fosfatasa alcalina (AP) no es más eficaz como sustrato que la IPX, es preferible debido a un efecto blanqueador en el sustrato de la IPX en la siguiente tinción de queratina. La AP tiene la ventaja de mejorar el contraste entre la tinción del sustrato y la tinción de la queratina.

- i) Se desparafinan los cortes con xileno y se hidratan en diluciones seriadas de etanol con agua de grifo.
- ii) Se sumergen en agua destilada.
- iii) Se incuban los cortes con anticuerpo policlonal anti-quitridio Rabbit 667, (solución salina tamponada de leche desnatada al 1% [p/v]/Tris a 1/1000) durante 45 minutos a 37°C.
- iv) Se lavan los cortes durante 5 minutos con TBS.
- v) Se incuban con Fosfatasa Alcalina anti-conejo/ratón ENVISION⁷ durante 20 minutos a 37°C.
- vi) Se lavan de nuevo (durante 5 minutos) con TBS.
- vii) Se añade sustrato⁸ BCIP/NBT a los cortes y se incuban durante 10 minutos.
- viii) Se enjuagan los cortes con agua destilada.

En esta fase, si no se requiere ninguna otra tinción, los cortes deben montarse en un gel⁹ de base acuosa y sellarse con un cubreobjetos.

Tinción de queratina – Tinción tricrómica de Hollande modificada

- i) Se extraen los portas del agua destilada (tras el inmunomarcaje) y se incuban con ácido fosfomolibdico¹⁰ al 1% (p/v) (solución C) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- ii) Se enjuagan con agua destilada y se incuban con solución Orange G¹¹ saturada (solución D) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

6 “ENVISION +”: Dako Peroxidase anti ratón Código 4000 (15 ml) o 4001 (110 ml)

7 DakoCytomation

8 DakoCytomation

9 Por ejemplo ImmunonTM, Thermo Shandon

10 Ajax/Univar

11 Gurr, Michrome #411

- iii) La mayor parte de la solución D debe decantarse y debe añadirse colorante verde claro SF al 0,2% (p/v) (solución E) sin enjuagar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- iv) Se colocan los portas (sin enjuagar) en etanol al 100% (x2), se enjuagan en xileno (x2) y se montan en un gel de montaje a base de xileno.
- v) Se dejan secar los portas hasta que el medio de montaje se haya establecido, y a continuación se observan en un microscopio óptico.

Interpretación de la tinción

El método de la tinción combinada da lugar a un color azul/púrpura en el caso de Bd, naranja en la queratina y pre-queratina, y verde en el colágeno y otros tejidos conjuntivos sub-epidérmicos.

Resultado de la tinción		Interpretación
Queratina	Bd	
+	–	Las ranas fue negativa a Bd. La presencia de queratina da confianza en el diagnóstico
+	+	La rana estaba infectada por Bd
–	–	Ambiguo. No puede realizarse una identificación negativa porque falta queratina y puede haber Bd en la piel mudada

4.3.1.3.2. Detección de Bd mediante un ELISA de captura de antígeno

Debido a la mala sensibilidad y especificidad del ELISA de captura de antígeno, no se recomienda para la detección de Bd.

4.3.1.3.3. Microscopía convencional e inmunoelectrónica

Principio de la prueba: la piel puede examinarse mediante microscopía electrónica. La microscopía electrónica convencional (examen de cortes ultrafinos) generará datos sobre la estructura de Bd. La utilización de anticuerpos específicos anti-Bd y de anticuerpos anti-especie marcados con oro permite examinar tanto la ultraestructura como la antigenicidad (Berger *et al.*, 2005).

Microscopía electrónica de transmisión convencional

Se fijan tejidos como describieron Berger *et al.*, 1999. En pocas palabras, se utiliza glutaraldehído tamponado al 2,5% (v/v) (cacodilato o fosfato) para fijar células durante 40 minutos. Tras la fijación primaria, las células se enjuagan en el mismo tampón (3 x 20 minutos), se post-fijan en tetróxido de osmio tamponado al 1% (p/v) (1 hora), se lavan (3 x 5 minutos) en agua doblemente destilada/de ósmosis inversa (RO) (1 hora), se deshidratan en soluciones seriadas de alcohol (70-100%) y se infiltran e incluyen en una resina de epoxi (por ejemplo, Spurr's o Epon).

Marcaje de los cortes con oro

- i) Para marcar con oro cortes de resina ultrafinos (Hyatt, 1991), debe prestarse atención a las pautas de fijación e inclusión. Así, por ejemplo, las células debe fijarse en glutaraldehído al 0,25% (v/v) con paraformaldehído al 2-4%. No se utiliza fijación secundaria y las células se infiltran y fijan en una resina acrílica¹².
- ii) Tras la fijación y la inclusión, se realizan cortes ultrafinos y se transfieren a rejillas bañadas en níquel.
- iii) Se realizan cortes a partir de los bloques adecuados.
- iv) Se bloquean en leche desnatada en polvo al 2% (p/v) en PBS-A (10 minutos).
- v) Se bloquean los aldehídos libres con glicina 0,1 M en PBS-A (20 minutos).
- vi) Se lavan en PBS-A (3 x 1 minuto). Este es un paso opcional que solo se utiliza si hay un exceso de aldehídos libres (un fondo alto puede ser indicativo de ello).
- vii) Si no se están utilizando complejos de proteína A-oro, entonces se bloquea en suero normal de la especie – este suero debe ser homólogo al utilizado para formar complejos con el oro. La dilución recomendada es de aproximadamente 1/40 (10 minutos).

12 Como LR White o HM20 Lowicryl

- viii) Se incuban en anticuerpos primarios. Si no se conocen los detalles de la incubación, se llevan a cabo reacciones iniciales con diluciones a 1/100 a 1/2700 (con diluciones a una tercera parte). Se diluyen los anticuerpos en gelatina de pescado de agua fría al 1% (v/v) en PBS-A, (60 minutos, temperatura ambiente).
- ix) Se enjuagan en gelatina de pescado de agua fría al 1% (v/v) en PBS-A, (6 x 3 minutos).
- x) Se incuban en anticuerpo secundario marcado con oro o complejo proteína A-oro o proteína G-oro. La dilución sugerida es 1/40 en PBS-A que contenga albúmina de suero bovino (BSA) al 1%, Tween 20 al 0,1% (v/v) y Triton X al 0,1% (v/v), 60 minutos, a temperatura ambiente.
- xi) Se enjuagan en PBS-A (6 x 3 minutos, a temperatura ambiente).
- xii) Se post-fijan en glutaraldehído al 2,5% (v/v) en PBS-A (5 minutos, a temperatura ambiente).
- xiii) Se enjuagan en agua (RO) (3 x 3 minutos, a temperatura ambiente).
- xiv) Se secan sobre papel de filtro (no importa de qué tipo).
- xv) Se tiñen en acetato de uranilo y acetato de plomo.

Interpretación de los resultados

Las membranas (externas) asociadas a zoosporas y a esporangios estarán marcadas con oro.

4.3.1.4. Técnicas moleculares, PCR TaqMan

Se puede identificar Bd utilizando la PCR TaqMan en tiempo real descrita y validada (Boyle *et al.*, 2004; Hyatt *et al.*, 2007). Esta prueba se puede ejecutar en menos de 24 horas a un coste relativamente bajo.

La RT-PCR TaqMan utiliza un conjunto de cebador/sonda diseñado para acceder a las regiones 5,8, 18 y 28S de ADN, muy conservadas y separadas por espaciadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2), así como por un espaciador intergénico que permite detectar Bd en hisopos, dedos cortados, filtros y discos orales de renacuajos (frescos o desecados). Las secuencias de 5,8, 18 y 28 S del ARNr están muy conservadas, mientras que la región ITS y el espaciador intergénico evolucionan rápidamente. La prueba tiene una sensibilidad de 0,1 equivalentes de zoosporas. También cuantifica el nivel de infección de los animales.

Dado que es una prueba muy sensible, deben tomarse todas las precauciones posibles para prevenir una contaminación (la prueba detectará cuantitativamente una sola zoospora de la muestra problema). Ello implica utilizar material desechable para cada muestra, ponerse guantes, realizar la prueba en cabinas de bioseguridad de Clase II, preparar alícuotas de los reactivos para ser utilizadas al momento, utilizar puntas filtradas, utilizar pipetas específicas y trabajar en una zona "limpia".

4.3.1.4.1 Preparación de los hisopos

Hisopos recomendados: Medical Wire y Equipment Co (Reino Unido) MW 100-100 procedentes de Biomirieux Aust.). No existen otros hisopos validados. Si se utilizan otros, debería exigirse la validación correspondiente.

- i) Se aplican los hisopos a la cara inferior de los pies, las patas y el parche pélvico energicamente 2-3 veces.
- ii) Se rompe el palo del hisopo y la punta se introduce en un tubo de 1,5 ml con tapón de rosca (con anillo en O) que contenga 30-40 mg de perlas de zirconio/sílice¹³ de 0,5 mm y 50 µl de PrepMan Ultra¹⁴.
- iii) Se homogeneiza utilizando un triturador de perlas (2 x 45 segundos). Se centrifuga en una microcentrífuga (30 segundos) entre cada homogeneización, para recuperar todo el material del tubo, y de nuevo tras la segunda homogeneización.
- iv) Se colocan los tubos de tapón de rosca en un soporte adecuado y se calientan las muestras (10 minutos a 100°C).
- v) Se enfrían (2 minutos) a temperatura ambiente y se microcentrifugan (3 minutos).
- vi) Se obtiene y guarda la mayor cantidad posible de sobrenadante – normalmente unos 20-40 µl.

13 Biospec. Products – Cat. # 11079105z

14 Applied Biosystems. Cat. # 4318930

Cuando se procesen grandes cantidades de sobrenadante, puede almacenarse en placas de 96 pocillos de fondo en V a filas alternas – puede realizarse una dilución (1/10 en agua) en las filas alternas de la placa. El sobrenadante obtenido puede almacenarse durante una semana a 4°C si la prueba se está realizando en ese momento, de lo contrario se guardará congelado a -20°C. Se sellan las placas para impedir la evaporación. Debe incluirse un control de extracción negativo cada vez para garantizar la ausencia de contaminación (es decir, un hisopo limpio en 50 µl de PrepMan Ultra).

4.3.1.4.2 Preparación de dedos cortados y aparatos bucales

La extracción es la misma que para los hisopos. Se utiliza aproximadamente 1 mg (no más). Se utilizan hojas de bisturí nuevas estériles y se trabaja en una superficie limpia y sin Bd (es decir, que no haya sido utilizada antes, como por ejemplo, una placa de Petri. En el caso de los dedos grandes, se arrancan tiras de piel del dedo utilizando hojas de bisturí limpias, placas de Petri y palillos, y se añade a razón de un 10% (p/v) del volumen de PrepMan Ultra como máximo, para evitar una sobrecarga del sistema de homogeneización; se aumenta el volumen de PrepMan Ultra si es necesario. Se coloca la muestra directamente en el tubo con perlas de zirconio y PrepMan Ultra como se ha descrito para los hisopos.

4.3.1.4.3. Extracción de ADN

Se extrae ADN de dedos cortados, hisopos, filtros o discos orales de renacuajos mediante PrepMan Ultra.

- i) Se añaden 50 µl de PrepMan Ultra (200 µl en el caso de los filtros) a cada muestra, junto con 30-40 mg de perlas de zirconio/sílice de 0,5 mm de diámetro¹⁵.
- ii) Se homogeneiza la muestra durante 45 segundos en un triturador de perlas, como por ejemplo una Mini Beadbeater 8¹⁶.
- iii) Se centrifuga (30 segundos, 13.000 **g** en una microcentrífuga, x2): con esto se recupera todo el material del tubo.
- iv) Se calienta la muestra a 100°C (10 minutos), se enfría (2 minutos) y se centrifuga (13.000 **g**, 3 minutos en una microcentrífuga).
- v) Se toma un 20% de sobrenadante y se utiliza de inmediato; la muestra se puede guardar a -20°C hasta que se utilice.

4.3.1.4.4. Preparación de los estándares

- i) Se siembran placas de cultivo TGhL con 2 ml de cultivo de *B. dendrobatidis* en crecimiento activo y se dejan crecer 4 a 5 días.
- ii) Se recogen las zoosporas inundando la placa dos veces con 2 ml de solución DS.
- iii) Se realiza un recuento de las zoosporas en un hemocitómetro (x4).
- iv) Se sedimentan 10⁷ zoosporas en una microcentrífuga (13.000 **g**, 1 minuto).
- v) Se extrae el sedimento y se vuelve a suspender en 200 µl de PrepMan Ultra.
- vi) Se hierve la suspensión durante 10 minutos, se enfría 2 minutos, se microcentrifuga 3 minutos y se extraen 150 µl de sobrenadante.
- vii) Se diluye ADN en agua destilada (2 × 10⁵ equivalentes de genoma por ml) y se guardan alícuotas a -20°C.

4.3.1.4.5. Controles internos

Tras el proceso de extracción puede haber inhibidores de la prueba TaqMan, como tierra en los hisopos, lo cual dará lugar a falsos negativos. La presencia de inhibidores en las muestras puede detectarse utilizando un control interno. Applied Biosystems® produce un amplicón sintético de un plásmido cuya secuencia no se sabe que tenga lugar en la naturaleza. Está marcado con VIC y limitado en cuanto a cebador para ser utilizado en pruebas múltiples¹⁷: debe incluirse 1 µl de mezcla Exo IPC 10 x y 0,5 µl de Exo IPC DNA 50x en la mezcla madre de 1 pocillo de los tres triplicados. Los valores Ct de la capa VIC deben ser comparables en los controles y en las muestras problema. Si el valor Ct de la muestra problema de la capa VIC es dos a cuatro veces más alto que el control negativo, la muestra debe diluirse a 1/100 o más.

15 Biospec Products

16 Biospec Products

17 ReactivosTaqMan exógenos como control positivo interno (Sonda VIC) # 4308323

4.3.1.4.6. Prueba TaqMan

- i) Se preparan alícuotas de 20 µl de una combinación de la mezcla madre/cebadores/sonda por pocillo.
- ii) Se añaden 5 µl de ADN a una dilución de 1/10 (en agua) en el caso de las muestras preparadas con PrepMan Ultra.
- iii) Para cada prueba, deben utilizarse estándares de 100, 10, 1 y 0,1 zoosporas para construir una curva estándar. Pueden prepararse soluciones madre de estándares y guardarse congeladas para diluirlas cuando sea necesario.
- iv) En cada placa también debe incluirse un control de extracción sin ADN (sin control molde).
- v) Todas las muestras que incluyan estándares debe llevarse a cabo por triplicado.
- vi) Secuencias de los cebadores y de la sonda:

<p>Cebador 1 (Cebador Directo): <i>ITS1-3 Bd</i>: 29 bases 5'-CCT-TGA-TAT-AAT-ACA-GTG-TGC-CAT-ATG-TC-3'</p>
<p>Cebador 2 (Cebador Inverso): <i>5.8S Bd</i>: 22 bases 5'-AGC-CAA-GAG-ATC-CGT-TGT-CAA-A-3'</p>
<p>Sonda: Chytr MGB2 de 15 nucleótidos – marcada con FAM. 5'-6FAM-CGA-GTC-GAA-CAA-AAT-MGBNFQ-3'</p>

En el Laboratorio de Referencia de la OIE, la amplificación se lleva a cabo en un termociclador ABI 7500 rápido o 7900 Sequence Detection System utilizando el siguiente programa: 50°C durante 2 minutos (digestión con uracilo N-deglicosilasa), 1 ciclo; 95°C durante 10 minutos (activación de la ADN termoestable Taq Gold presente en la mezcla madre), 1 ciclo; 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 45 ciclos. Nota: Los cebadores y la sonda se vuelven a suspender según las instrucciones del fabricante.

Condiciones de los ciclos:

50°C	2 minutos
95°C	10 minutos
45 repeticiones de:	
95°C	15 segundos
60°C	1 minuto

4.3.1.4.7 Interpretación de los datos

Tras terminar la prueba, los resultados deben analizarse del siguiente modo:

- i) Se lleva a cabo un OBt (establecimiento de valores que quedan fuera del intervalo, valor basal y valor umbral), fijando el intervalo basal en 3, 15 y el umbral a un Delta R_N de 0,1 (Bd y control interno).
- ii) Si las muestras positivas tienen un valor $C_T < 18$, se reduce el valor basal superior, pasándolo de 15 a, como mínimo, 3 menos que el valor C_T de la muestra.

Se determina si la prueba es válida según los siguientes criterios:

- i) Pocillos control positivos: las curvas de amplificación de la capa de tinción FAM deben tener una forma característica.
- ii) El control positivo exógeno no debe ser más de dos veces superior a su valor determinado en el control negativo. Si el valor C_T es más de dos veces superior, la prueba ha resultado inhibida y la muestra debe diluirse (a 1/100).
- iii) Extracción con control sin molde y con control negativo: se determina la ausencia de contaminación si se observa que no hay curvas de amplificación características en la capa de FAM. La capa de tinción VIC debe tener un valor C_T superior a 39.
- iv) Curva estándar: los estándares a concentraciones de 1/100, 10, 1, 0,1 se encuentran dentro del intervalo especificado del estándar de referencia. La r^2 es superior a 0,98.

Si la prueba se considera válida, los resultados de los pocillos con muestra problema pueden interpretarse utilizando los siguientes criterios:

Resultados positivos

Definición: Presencia de amplicones específicos, indicada por una curva de amplificación característica similar a la del control positivo con un valor de C_T inferior o igual a 39 (en los tres pocillos).

Resultados negativos

Definición: Ausencia de amplicones específicos, indicados por una ausencia de curva de amplificación característica y con un valor C_T superior a 41 (en los tres pocillos).

Resultados indeterminados

Definición: presencia de curvas de amplificación características similares al control positivo pero con un valor C_T de entre 39 y 41 o una cantidad inferior de equivalentes de zoospora solo en uno o dos pocillos). Estos resultados indican que es necesario repetir la prueba.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico de la quitridiomycosis se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c= el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda actualmente para este fin; y NA = no es aplicable. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales (véase el Capítulo 1.1.2 de este *Manual Acuático*), su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Huevos/e spermata	Renacuajos	Metamorfos	Adultos		
Signos macroscópicos	na	d	d	d	d	d
Histopatología	na	c	c	c	c	c
Tinción por inmunoperoxidasa	na	c	c	c	b	b
ME de transmisión	na	d	d	d	c	c
Microscopía inmunoelectrónica	na	d	d	d	c	c
Aislamiento	na	na	na	na	na	na
ELISA de captura de antígeno	na	na	na	na	na	na
ELISA de captura de anticuerpo	na	na	na	na	na	na

PCR TaqMan	na	a	a	a	a	a
Análisis de la secuencia del producto de la PCR	na	b	b	b	b	a

La histopatología es muy específica; en animales enfermos también es muy sensible.
ELISA = enzimoimmunoanálisis; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; na: no es aplicable.

6. Prueba(s) recomendadas para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de quitridiomycosis

El muestreo y las pruebas TaqMan asociadas descritos en este artículo se pueden utilizar para la vigilancia dirigida a la Bd. En un artículo reciente (Skerratt *et al.*, 2010) puede hallarse un protocolo de estudio revisado por pares que se puede utilizar para el mapeo de Bd en zonas geográficas definidas.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Anfibios aparentemente sanos o moribundos que presenten una conducta aberrante y zonas localizadas de piel mudada. En la piel deben hallarse zoosporas y esporangios que se tiñan con anticuerpos adquiridos en el Laboratorio de Referencia.

7.2. Definición de caso confirmado

Anfibios aparentemente sanos, moribundos o muertos cuya piel contenga Bd según una prueba TaqMan.
Nota: Los patólogos con experiencia puede utilizar la histología (cortes teñidos con hematoxilina y eosina) con confianza porque no existe ningún otro hongo que afecte a los anfibios y que tenga una estructura similar (esporangios con tubos de secreción, zoosporas, situados dentro de las células del estrato córneo); no obstante, para que el diagnóstico se considere definitivo, debe haberse realizado mediante una PCR TaqMan.

8. Bibliografía

BERGER L., SPEARE R., DASZAK P., GREEN D., CUNNINGHAM A., GOGGIN C., SLOCOMBE R., RAGAN M., HYATT A., McDONALD K., HINES H., LIPS K., MARANTELLI G. & PARKES H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9031–9036.

BERGER L., HYATT A., OLSEN V., HENGSTBERGER S., BOYLE D., MARANTELLI G., HUMPHREYS K. & LONGCORE J. (2002). Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 213–220.

BERGER L., HYATT A., SPEARE R. & LONGCORE J. (2005a). Life cycle stages of *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore *et al.* 1999, the amphibian chytrid. *Dis. Aquat. Org.*, **68**, 51–63.

BERGER L., SPEARE R. & SKERRATT L. (2005b). Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs (*Litoria caerulea*) with severe chytridiomycosis. *Dis. Aquat. Org.*, **68**, 65–70.

BERGER L., LONGCORE J., SPEARE R., HYATT A. & SKERRATT L.F. (2009a). Fungal Diseases in Amphibians. Pp 2986–3052 in: *Amphibian Biology, Volume 8 Amphibian Decline: Disease, Parasites, Maladies, and Pollution*. Edited by H Heatwole and JW Wilkinson, Surrey Beatty & Sons. NSW.

BERGER L., SPEARE R., MARANTELLI G. & SKERRATT L. (2009b). A zoospore inhibition technique to evaluate the activity of antifungal compounds against *Batrachochytrium dendrobatidis* and unsuccessful treatment of experimentally infected green tree frogs (*Litoria caerulea*) by fluconazole and bezalkonium chloride. *Res. Vet. Sci.*, **87**, 106–110.

BERGER L., SPEARE R., PESSIER A., VOYLES J. & SKERRATT L.F. (2010). Treatment of chytridiomycosis requires urgent clinical trials. *Dis. Aquat. Org.*, Special 4: Chytridiomycosis: an emerging disease, p17.

- BLAUSTEIN A., ROMANSIC J.M., SCHEESSELE 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 Biol.*, **19**, 1460–1468.
- BOYLE D.G., BOYLE D.B., OLSEN V., MORGAN J.A.T. & HYATT A.D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 133–139.
- BRIGGS C.J., VREDENBURG V.T., KNAPP R.A. & RACHOWICZ L.J. (2005). Investigating the population-level effects of chytridiomycosis: an emerging infectious disease of amphibians. *Ecology*, **86**, 3149–3159.
- DAVIDSON E.W., PARRIS M., COLLINS J.P., LONGCORE J.E., PESSIER A.P. & BRUNNER J. (2003). Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia.*, **3**, 601–607.
- DRURY R.B. & WALLINGTON E. A. (1980). Carleton's Histological Technique, Oxford University Press, 520 p.
- FISHER M.C., GARNER T.W.J. & WALKER S.F. (2009). Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Microbiology*, **63**, 291–310.
- FORZAN M.J., GUNN H. & SCOTT P. (2008). Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs, diagnosis, treatment, and control. *J. Zoo. Wildl. Med.*, **39**, 406–411.
- GARNER T.W., GARCIA G., CARROLL B. & FISHER M.C. (2009). Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 257–260.
- HANSELMANN R., RODRIQUE A., LAMPO, M., FAJARDO-RAMOS, L., AGUIRRE A., MARM K.A., RODREQUIZ, P. & DASZAK, P. (2004). Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biol. Conserv.* **120**, 115–119.
- HOHREITER D.W. & RIGG D.K. (2001). Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde. *Chemosphere*, **45**, 471–486.
- HYATT A.D. (1991). Immunogold labelling techniques, *In: Electron Microscopy in Biology: a Practical Approach*, Harris R., ed. IRL Press, Oxford, UK, 59–81.
- 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. & COLLING A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 175–192.
- JOHNSON M., BERGER L., PHILLIPS L. & SPEARE R. (2003). *In vitro* evaluation of chemical disinfectants and physical techniques against the amphibian chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 255–260.
- JOHNSON M. & SPEARE R. (2003). Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and control implications. *Dis. Aquat. Org.*, **9** (8), 922–925.
- JOHNSON M. & SPEARE R. (2005). Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 181–186.
- LIPS K., BREM F., BRENES F., REEVE J., ALFORD R., VOYLES J., CAREY C., LIVO L., PESSIER A. & COLLINS J. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, (9) 3165–3170.
- LONGCORE J., PESSIER A. & NICHOLS D. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, **91**, 219–227.
- LONGCORE J.R., LONGCORE J.E., PESSIER A.P. & HALTEMAN W.A. (2007). Chytridiomycosis widespread in anurans of northeastern United States. *J. Wildl. Management*, **71**, 435–444.
- MARANTELLI G., BERGER L., SPEARE R. & KEEGAN L. (2004). Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pacific Conservation Biol.*, **10** (1), 173–179.

MARTEL P., VAN ROOIJ G. & VERCAUTEREN K., BAERT L. & VAN WAEYENBERGHE P. (2010). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology*, Month 2010, Early Online, 1–7.

NICHOLS D.K. & LAMIRANDE E.W. (2009). Successful treatment of chytridiomycosis. *Froglog* 2001; 46.

OLSEN V., HYATT A.D., BOYLE D.G. & MENDEZ D. (2004). Co-localisation of *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin for enhanced diagnosis of chytridiomycosis in frogs. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 85–88.

PARKER J.M., MIKAEILIAN I., HAHN N. & DIGGS H.E. (2002). Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comp. Med.*, **52**, 265–268.

PESSIER A.P., NICHOLS D.K., LONGCORE J.E. & FULLER M.S. (1999). Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 194–199.

PIOTROWSKI J.S., ANNIS S.L. & LONGCORE J.F. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, **96** (1), 9–15.

RETALICK R.W.R., MCCALLUM H. & SPEARE R. (2004). Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community postdecline. *PLoS Biol.*, **2**, 1965–1971.

PHILLOTT A.D., SPEARE R., HINES H.B., MEYER E., SKERRATT L.F., McDONALD K.R., CASHINS S.D., MENDEZ D., BERGER L. (2010). Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 175-185.

ROWLEY J.J.L., CHAN S.K.F., TANG W.S., SPEARE R., SKERRATT L.F., ALFORD R.A., CHEUNG K.S., HO C.Y. & CAMPBELL R. (2007). Survey for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hong Kong in native amphibians and in the international amphibian trade. *Dis. Aquat. Org.*, **78**, 87–95.

SKERRATT, L.F., BERGER, L., SPEARE, R., CASHINS, S., McDONALD, K., PHILLOTT, A., HINES, H. & KENYON N. (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, **4**, 125–34.

SKERRATT L.F., McDONALD KR, HINES H.B., BERGER L, MENDEZ D., PHILLOTT A.,D., CASHINS S.D., MURRAY K. & SPEARE R. (2010). Validation of the Mapping Protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* in Queensland, Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 117-129..

SMITH K., SAX D. & LAFFERTY K. (2006). Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conservation Biol.*, **5**, 1349–1357.

VOYLES J., YOUNG S., BERGER L., CAMPBELL G., VOYLES W.F., DINUDOM A., COOK D., WEBB R., ALFORD R.A., SKERRATT L.F. & RICK SPEARE R. (2009). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. *Science*, **23**, 582–585.

WILLIAMS S. & HERO J. (1998). Rainforest frogs of the Australian wet tropics: guild classification and the ecological similarity of declining species. *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.*, **265**, 597–602.

WOODHAMS D.C. & ALFORD R.A. (2005). The ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biol.*, **19**, 1449–1459.

WOODHAMS D.C., ALFORD R.A. & MARANTELLI G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 65–67.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).