

4.10 REGISTRO DE HONGOS. PROTOCOLOS EN CAMPO Y LABORATORIO

Romina Ghirardi¹, María Luz Arellano² & Judit Dopazo³

¹ Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL), Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo s/n, Santa Fe, provincia de Santa Fe / Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Católica de Santa Fe, Echagüe 7151, Santa Fe, Santa Fe, Argentina.

² Sección Herpetología, División Zoología de Vertebrados, CONICET - Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Avenida 122 y 60 s/n, 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

³ Instituto Multidisciplinario sobre Ecosistemas y Desarrollo Sustentable. UNCPBA y Cátedra de Histología, Embriología y Teratología. Departamento de Cs. Biológicas, FCV, UNCPBA, Buenos Aires, Argentina.

Entre los responsables de la declinación global de anfibios, las enfermedades han sido reconocidas como uno de los factores importantes en todo el mundo⁽¹⁻¹²⁾. Los agentes etiológicos que las causan son numerosos y entre los más comunes podemos mencionar a los virus, bacterias, ácaros, gusanos, mohos y hongos. En esta sección nos centraremos en las técnicas para la identificación de la presencia e infección por hongos en los diferentes estadios de la ontogenia de anfibios.

Batrachochytrium dendrobatidis -*Bd*- (Reino Fungi: Clase Chytridiomycetes: Orden Rhizophydiales) fue, hasta hace dos décadas, conocido sólo como parásito de plantas, algas, protistas e invertebrados. La especie que afecta a los anfibios fue descrita en el año 1999, siendo el primer caso conocido en el que un quitridio afecta a un vertebrado^(13,14). Este hongo se caracteriza por afectar el estrato superficial (córneo y granuloso) de la piel de los anfibios anuros^(15,16). Las lesiones en la piel generalmente son leves, y la hiperqueratosis se presenta como el cambio más evidente. Algunos ejemplares pueden desarrollar hiperplasia irregular, desorden en las células de la epidermis, espongirosis, erosiones y ulceraciones ocasionales^(15,16). Este tipo de alteraciones interfieren con varias funciones epiteliales de los anfibios, incluyendo la circulación y mantenimiento de agua y sales, la respiración y su rol como barrera contra las toxinas y agentes de infección⁽¹⁷⁾. Por otro lado, estas modificaciones en las funciones epiteliales repercuten en el comportamiento de juveniles y adultos, generando aletargamiento, adelgazamiento por falta de alimentación y disminución en el brillo de la piel. Sin embargo, existen especies de anfibios que pueden actuar como reservorios de *Bd* sin presentar signos de infección y, en la mayoría de los animales infectados en estado silvestre no se han observado estos signos clínicos o el periodo de manifestación de los mismos suele ser muy corto limitándose a algunos individuos que luego morirán⁽¹⁷⁾.

Antecedentes de técnicas de detección de *Batrachochytrium dendrobatidis*

Las primeras técnicas utilizadas para la evaluación de presencia del hongo quitridio en anfibios fueron observaciones de los ejemplares bajo lupa (**Figura 4.10.1** y **Figura 4.10.2**) y cortes histológicos de piel (**Figura 4.10.3**)⁽¹⁶⁻²⁰⁾. La visualización de mudas de piel bajo lupa se propone teniendo en cuenta que un signo clínico observado en la quitridiomycosis es la muda excesiva de piel de la superficie epidérmica. La piel mudada a menudo procede del abdomen, las extremidades y los pies^(16,21,22), y en su observación bajo lupa se pueden identificar procesos de hiperqueratosis y presencia de zoosporangios. Este tipo de metodología resulta accesible, ya que proporciona medi-

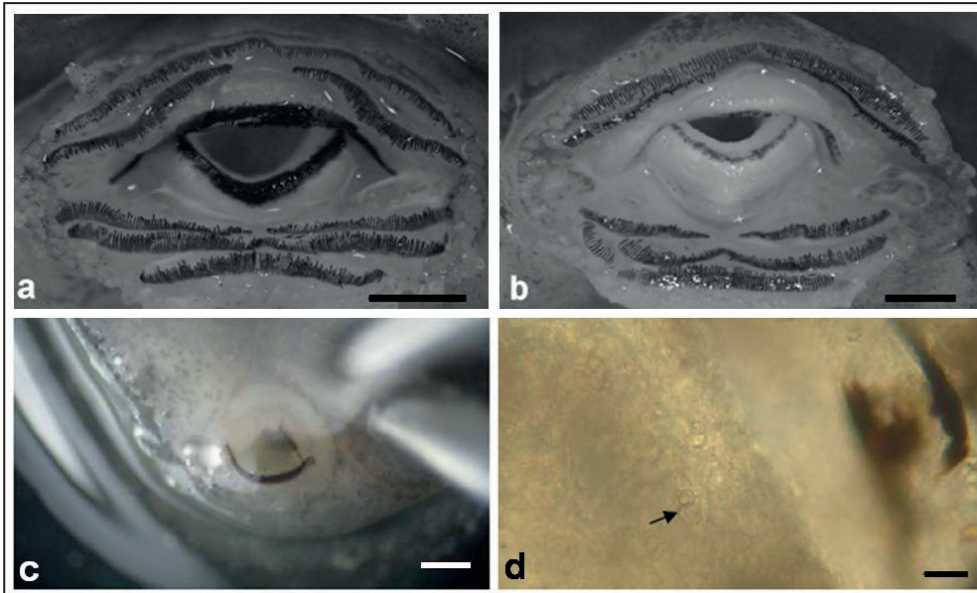


Figura 4.10.1. Diagnóstico directo, se observan las partes bucales queratinizadas de un individuo no infectado (a) y uno infectado con despigmentación (b) observación en lupa (c) y en microscopio óptico (400X) (d). Escala: (a) 0,42 mm; (b) 0,46 mm; (c) 2,5 mm y (d) 20 μ m. Fotos: María Luz Arellano.

ciones cuantitativas de *Bd* y aumenta la confianza en la detección de estudios histológicos⁽²⁰⁾. Complementariamente a la observación bajo lupa, durante los primeros años del descubrimiento de *Bd*, usando técnicas histológicas, se incrementó exponencialmente el número de registros de *Bd* en diferentes regiones y especies de anfibios a nivel mundial^(23,24,25). Con este panorama y complementariamente a los estudios histológicos, se propusieron nuevas técnicas de detección. Adicionalmente, la técnica histológica o de observación de mudas de piel permitió hacer análisis en especímenes de colección conservados tanto en alcohol como en formol cuando se planteó en análisis retrospectivo de la infección⁽²⁶⁾.

Sin embargo, y pese a que la histología y la observación bajo lupa se convirtieron en métodos ampliamente utilizados, se comenzaron a encontrar puntos débiles en estas técnicas para el estudio de *Bd* relacionados a:

- (1) sensibilidad: la superficie observada resulta demasiado pequeña en relación a la superficie total del individuo estudiado, lo que puede generar muchos falsos negativos⁽²⁷⁾;
- (2) especificidad: deja abierta la posibilidad de falsos positivos por similitud de las esporas de *Bd* con las de otros hongos y/o por el posible sesgo del observador;
- (3) invasión: para la técnica histológica se requiere una muestra de piel por lo que se debe sacrificar el individuo⁽²⁸⁾ o recurrir a la amputación de dedos^(27,29);
- (4) insumo de tiempo: la técnica histológica requiere un tiempo prolongado

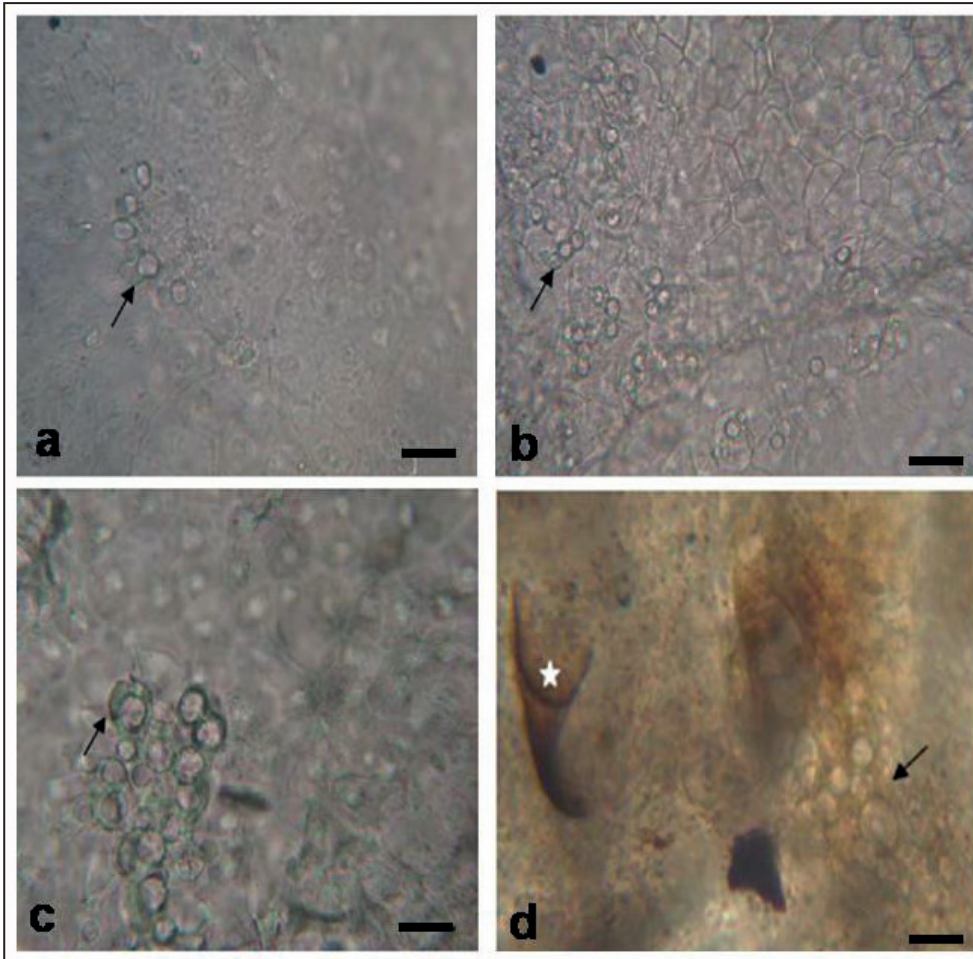


Figura 4.10.2. Preparados húmedos, se observa muda de piel con zoosporangios vacíos (flechas) en *Boana pulchella* (a), *Pseudopaludicola falcipes* (b), *Odontophrynus americanus* (c) y partes bucales de *Rhinella fernandezae* (d) (nótese los queratodontes-estrella-). Escalas: (a) 16 μ m 200X, (b) 24 μ m 100X, (c) 18 μ m 400X y (d) 10 μ m 400X. Fotos: María Luz Arellano.

de procesado de la muestra, y una vez montada en los portaobjetos, un tiempo adicional de observación en el microscopio.

Cuando se comienza a trabajar con *Bd* este tipo de técnicas resulta accesible a los investigadores, si se cuenta con un laboratorio de histología el trabajo se hace fácil, pero aún si no se cuenta con el laboratorio es un servicio sencillo de tercerizar con técnicos especializados o con laboratorios de histología.

Si bien se ha sugerido que la quitridiomycosis en individuos post metamórficos y adultos gravemente infectados se puede diagnosticar fácilmente por observación directa de signos clínicos como desprendimiento epidérmico anormal, enrojecimiento de las superficies ventrales y cambios de comportamiento tales como letargo y pérdida del reflejo de pronación⁽¹⁸⁾, los individuos que presentan estas últimas etapas de la infección rara vez se encuentran en ambientes naturales. Esto es debido tanto al corto período de sobrevivencia, como a la rapidez con la que son eliminados del ambiente, ya sea por descomposición o por depredación por otros animales.

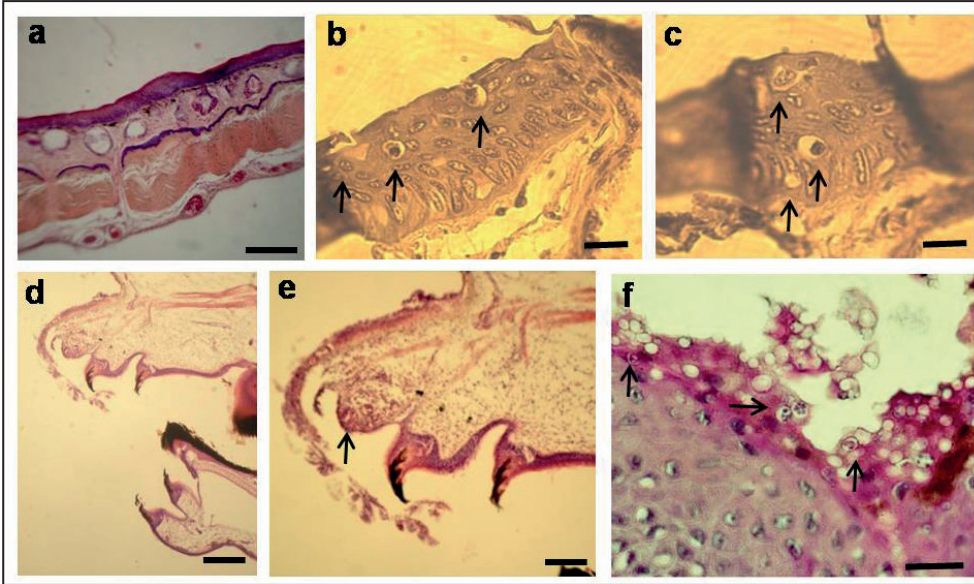


Figura 4.10.3. Cortes histológicos de sección de piel de *Leptodactylus luctator* sin señales de *Bd* (a) y con zoosporangios en diferentes grados de desarrollo (b y c) -flechas-. Corte de parte bucal de larva sin señales de *Bd* (d) y con zoosporangios en los queratodotes (e y f) -flechas-. Escala: (a) 0,15mm 200X, (b) 20µm 400X, (c) 15µm 400X, (d) 70µm 200X, (e) 35µm 200X y (f) 30µm 400X. Fotos: (a-e) Romina Ghirardi y (f) María Luz Arellano.

En zonas de humedales con aguas turbias, muy vegetadas y con clima cálido, los individuos muertos duran muy poco en el ambiente antes de su descomposición. Incluso si los ejemplares se encuentran entre camalotales o juncuales es muy difícil visualizarlos. Por el contrario, algunas regiones presentan cuerpos de agua transparente, climas más fríos y poca vegetación en los cuerpos de agua y alrededores, lo que permite visualizar con más facilidad si hay individuos muertos o moribundos en el ambiente (**Figura 4.10.4**).

Considerando estas diferencias, y las dificultades en algunos ambientes para evaluar la salud de los individuos a simple vista en campo, las pruebas para detección de *Bd* en anfibios silvestres requieren de análisis de laboratorio de muestras tomadas de individuos aparentemente sanos. Esto genera controversias, ya que se deben sacrificar individuos aparentemente sanos para evaluar una posible infección por el hongo con técnicas histológicas que resultan altamente invasivas o deletéreas.

Para contrarrestar estas técnicas invasivas utilizadas originalmente, se comenzaron a realizar estudios de presencia de *Bd* por medio de técnicas moleculares (amplificación por PCR:^{30, 31}) mediante hisopado de la piel de los individuos. Este tipo de técnica resolvió los inconvenientes de la observación bajo lupa o de las técnicas histológicas relacionados a:

(1) sensibilidad: con el hisopado se puede cubrir toda la superficie piel donde se concentra el hongo en cada individuo a analizar;

(2) especificidad: el análisis molecular sólo resulta positivo ante la presencia de *Bd* y no de otro hongo o agente etiológico similar;

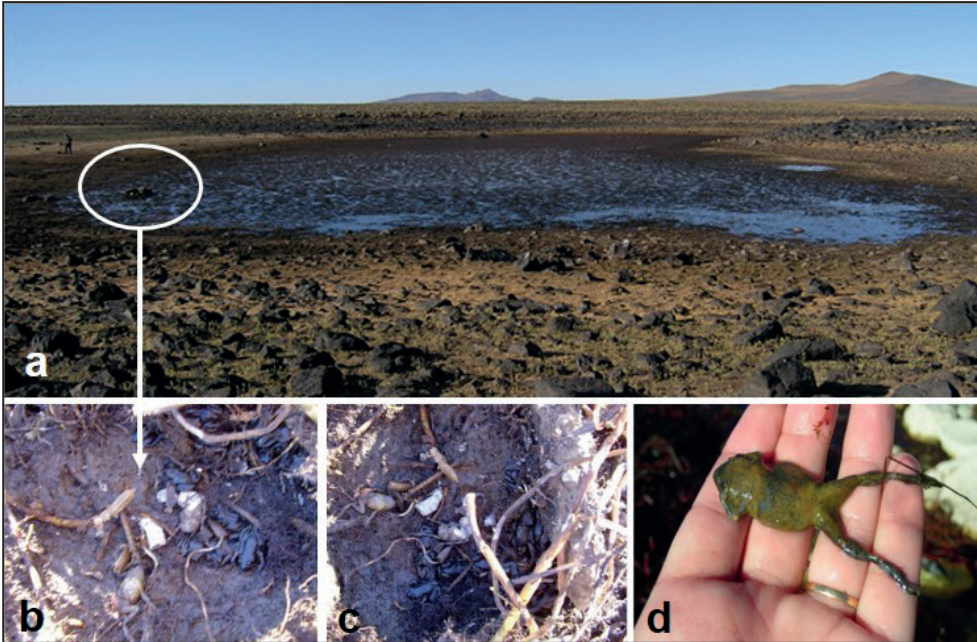


Figura 4.10.4. Laguna Hueso (a), en Parque Nacional Laguna Blanca (Neuquén). Se marca con un círculo la pirca de piedras donde se registraron ejemplares de *Atelognathus patagonicus* muertos y moribundos, con signos típicos de quitridiomycosis (b - d). Fotos: (a y d) Ma. Gabriela Perrotti, (b y c) Javier A. López.

(3) invasión: solo se frota un hisopo sobre el individuo a analizar y se lo libera inmediatamente en su ambiente (no es necesario sacrificarlo);

(4) insumo de tiempo: en un laboratorio equipado adecuadamente no se requiere demasiado tiempo para el procedimiento. Una vez que el laboratorio recibe la muestra, ésta puede ser procesada y analizada en el mismo día si el laboratorio se encuentra adecuadamente equipado y preparado para ello, a diferencia de la observación bajo lupa o con técnicas histológicas, que una vez procesada la muestra se debe continuar con la observación minuciosa en lupa o microscopio.

A pesar de que las técnicas moleculares son más costosas, poseen la ventaja de ser prácticas no letales y muy poco invasivas para los individuos en relación a la toma de muestra, por lo que se volvieron muy populares y utilizadas en todo el mundo.

Con el avance de las técnicas moleculares de PCR tradicional, y con el objetivo de cuantificar la infección en los individuos afectados, se comienza a utilizar la técnica de PCR cuantitativo (qPCR adultos:^{27,32,33}; qPCR larvas:⁽³⁴⁾ con mejoras en la capacidad analítica de la prueba al poder cuantificar la infección⁽³⁵⁾.

Con la mejora de las técnicas de detección de *Bd*, se han desarrollado análisis moleculares para identificar la presencia de zoosporas liberadas en el ambiente por individuos infectados. Este tipo de análisis moleculares se

adecuaron a muestras de suelo y agua para la detección de *Bd*^(36,37,38) y en muestras de ejemplares de colecciones de museo⁽³⁹⁾. La misma técnica de análisis molecular ha sido puesta a punto para estudios experimentales con individuos infectados en un medio acuático⁽⁴⁰⁾. Este tipo de análisis añade información novedosa, ya que no sólo se puede evaluar la infección de los individuos, sino también estudiar la periodicidad de la liberación de zoosporas al medio⁽⁴⁰⁾.

Mediante la aplicación complementaria de todas las técnicas antes mencionadas, actualmente el estudio de la presencia de *Bd* en anfibios y en el ambiente se puede realizar en muestras de diversos orígenes y en casi todas las regiones del mundo.

Descripción de los métodos de registro e identificación de *Bd*

1. Registro en campo

1.a. Diagnóstico directo

El diagnóstico de *Bd* mediante la observación directa de los anfibios en campo es una tarea difícil. En la mayoría de los animales infectados no se observan signos clínicos específicos muy evidentes. En el caso de las *larvas*, es posible observar a simple vista o bajo lupa individuos infectados por la presencia de despigmentación de la capa epidérmica del disco oral, la presencia de dientes acortados o la pérdida de los mismos (**Figura 4.10.1**)⁽¹⁷⁾. Sin embargo, estos no son signos específicos de *Bd*, y muchas veces dependiendo del estadio puede ser un proceso natural por inicio de metamorfosis. Por otro lado, en los juveniles y adultos, el periodo de manifestación de los signos suele ser corto y se limita a los anfibios que pronto morirán. Como signos clínicos observables a simple vista, en las infecciones graves a veces pueden notarse alteraciones macroscópicas de la piel, que consisten en una muda anómala (más frecuente de lo normal y en trozos más pequeños) y eritema, pero estos signos clínicos no son específicos de la quitridiomycosis. Por otro lado, entre las alteraciones del comportamiento, predominan aquellas vinculadas a movimientos lentos y descoordinados, posturas de sedestación anómalas, espasmos tetánicos, pérdida del reflejo de erguido y parálisis⁽¹⁷⁾ así como aletargamiento, adelgazamiento por falta de alimentación y disminución en el brillo de la piel (**Figura 4.10.4**).

Como muchas veces el diagnóstico directo resulta difícil, sino imposible de realizar, se describen a continuación las técnicas de diagnóstico más frecuen-

tes utilizadas, que incluyen colecta de muestras y trabajo en laboratorio, desde lo menos a lo más invasivo.

1.b. Colecta de muestras

1.b.i. Toma de muestra de piel (raspado, frotis o mudas)

El examen de raspados o frotis de piel es un método rápido y sencillo para identificar *Bd* y puede realizarse con muestras frescas, congeladas o fijadas⁽⁴¹⁾. La piel mudada se levanta o se raspa sobre el ejemplar (mediante una hoja de bisturí o una espátula de plástico estéril) y se extiende sobre un portaobjeto con 1 o 2 gotas de agua o de solución salina, se cubre con un cubreobjetos y se examina la preparación con un microscopio óptico^(17,42).

Para obtener las mudas, otra opción es colocar individuos vivos en recipientes individuales con agua y esperar 24hs. Luego de transcurrido ese período, se toma la piel desprendida, se la fija en formol 10% para posterior observación bajo microscopio óptico⁽²⁰⁾.

1.b.ii. Hisopado para análisis moleculares

Los individuos a ser hisopados deben ser cuidadosamente manipulados con guantes de manera individual. Cuando se está pasando el hisopo estéril, se debe aplicar cierta presión, sin lastimar al animal.

En caso de tratarse de individuos “sucios” (por ej. cubiertos de barro) se recomienda, previo al hisopado, quitarles cuidadosamente la suciedad con agua procedente del propio lugar donde se encuentra el individuo a muestrear o en su defecto con agua destilada.

- En las **larvas** se debe pasar un hisopo, de 5 a 8 veces, en la zona del disco oral. Debe insertarse el hisopo en la boca y hacerlo girar varias veces para obtener muestra de los aparatos bucales^(17,34,42,43).

- En los **juveniles y adultos** se debe pasar el hisopo aproximadamente 30 veces sobre el individuo de la siguiente manera:

10 veces sobre la superficie inguinal (5 en lateral derecho- 5 en lateral izquierdo).

10 veces en patas delanteras (5 en derecha y 5 en izquierda).

10 veces en patas traseras (5 en derecha y 5 en izquierda).

Una vez hisopado el individuo (larva, juvenil o adulto), se debe secar el hiso-

po al aire (ventilando en círculos en el aire unas 4 o 5 veces), y luego colocarlo en el tubo, con la cabeza hacia el fondo del tubo y teniendo la precaución de que el hisopo no toque la tapa del mismo. Las muestras pueden ser guardadas a una temperatura ambiente por hasta 72 hs (evitando las temperaturas extremas y la luz solar directa), aunque es óptimo mantener las muestras frescas y colocarlas tan pronto como sea posible en heladera a 4 °C.

El almacenamiento de las muestras en etanol al 70% no se recomienda para el procedimiento de PCR convencional ni de qPCR (excepto si el laboratorio cuenta con una centrífuga al vacío). Por este motivo es importante contactarse, previamente al muestreo, con el laboratorio que realizará el estudio. Para más información ver Pessier y Mendelson⁽⁴²⁾.

1.b.iii. Colecta de agua filtrada para análisis moleculares

Para la determinación de *Bd* en “baños” de agua, los individuos con sospecha de infección colectados en el campo se deben colocar en recipientes individuales estériles de polipropileno con 150 ml de agua del ambiente. El agua del “baño” puede analizarse directamente tras una inmersión de 15 minutos (si hay tiempo se puede dejar a los individuos 24 hrs en el baño) o como alternativa, puede filtrarse el agua del baño y guardar los filtros secos (por ejemplo, filtros de 0.45 μm^2 a temperatura ambiente o a 4 °C) hasta que sean analizados⁽¹⁷⁾.

1.b.iv. Toma de muestra para ADN ambiental (agua y sedimento)

Para la toma de muestra de ambiente, se sugiere seguir las técnicas de Míaud y col.⁽⁴⁴⁾, Barnes y col.⁽³⁷⁾ y Spitzen-van der Sluijs y col.⁽⁴⁵⁾. Para ello se deben recolectar 250 ml de agua superficial y realizar una filtración en el lugar usando una bomba de vacío manual y cinco filtros de 1 μm (Membranas Nuclepore Track-Etch®, Whatman, Maidstone, Reino Unido), con una submuestra de 50 ml de agua filtrada en cada uno. Para la toma de muestra de sedimento se sugiere seguir las técnicas de Branelli y col.⁽⁴⁶⁾. Para ello se debe coleccionar una porción de sedimento del fondo del cuerpo de agua (aproximadamente a 0,5 m de la orilla). Tanto los filtros de agua como las muestras de sedimento deben ser llevadas al laboratorio en hielo y conservadas a -20 °C hasta su procesamiento.

1.b.v. Toma de muestra de dedos

Esta técnica se utiliza tanto para cortes histológicos como para análisis moleculares. En campo se colecta al animal y se le corta una falange del dedo para el examen⁽²³⁾ y los anfibios pueden ser liberados sin necesidad de sacrificar al animal. Esta no es una técnica muy utilizada por cuestiones éticas e incertidumbre sobre la supervivencia de los individuos liberados una vez hecha la escisión⁽⁴²⁾.

En el caso de que ninguna de las opciones anteriores sea posible para tomar la muestra y liberar a los individuos, se debe proceder a la colecta de los ejemplares para su posterior análisis en laboratorio.

1.b.vi. Colecta de individuos

La colecta de individuos para análisis de *Bd* se debe realizar siguiendo los protocolos estándares de muestreo para larvas y adultos descriptos en OIE⁽¹⁷⁾ y Pessier y Mendelson⁽⁴²⁾ teniendo los recaudos necesarios para evitar la contaminación cruzada por *Bd*.

- Si el objetivo final de la colecta es **observación en lupa** o **realización de cortes histológicos**, los individuos deben ser eutanizados siguiendo técnicas estándares (ver el apartado correspondiente en este manual) y fijados en formol 10% para su posterior procesamiento.

- Si el objetivo final de la colecta es determinación de *Bd* por **técnicas moleculares** y los ejemplares deben ser trasladados al laboratorio para la toma de muestras pero luego pueden ser restituidos a su hábitat, se deben mantener vivos en recipientes individuales hasta que se les realice el hisopado.

En el caso de necesitar un diagnóstico individual, los individuos juveniles o adultos deben ser manipulados prestando especial atención para que no se contaminen entre ellos. Para esto cada individuo debe ser manipulado/colectado con guantes de nitrilo, y los guantes deben ser renovados para la manipulación/colecta de cada nuevo ejemplar. En caso de encontrarse en un sitio con muchos individuos, se pueden utilizar bolsas de nylon para capturarlos. Se debe utilizar la bolsa a modo de guante para realizar la captura de cada uno de los individuos, manteniéndolos en la misma hasta el momento de proceder a realizar el hisopado.

En el caso de estar realizando una evaluación a nivel poblacional o de sitio, y de no tener opción de mantenimiento individual, se pueden colectar los ejemplares en recipientes compartidos. En este caso, se evalúa sólo la presencia del hongo en el ambiente, sin poder cuantificar la carga en cada ejemplar colectado.

2. Trabajo de laboratorio

La determinación de presencia de *Bd* en el laboratorio se puede realizar por diferentes técnicas que requieren el reconocimiento de la morfología del hongo según con qué instrumento se observe.

2.a. Cómo identificar al *Bd* en los anfibios

2.a.i. Reconocimiento de *Bd* mediante observación en lupa

En las **preparaciones húmedas por raspado, frotis o mudas**, normalmente se observan esporangios (5-13 μm) intracelulares de forma entre redonda y ovalada formando agrupaciones (**Figura 4.10.2**). En la piel mudada, el estadio más frecuente es el de esporangios vacíos viejos, aunque también es frecuente hallar esporangios que contienen 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⁽¹⁷⁾.

2.a.ii. Reconocimiento de *Bd* mediante observación en microscopio en un preparado histológico

Existe numerosa literatura detallada que describe las características morfológicas del hongo *Bd*^(13,16,21). Ver **Figura 4.10.3** para observar distintos cortes y estadios de *Bd* en la piel, y a continuación, se describirán brevemente algunas de las características que podrían resultar más útiles:

El talo suele medir entre 7 a 20 μm en la sección histológica. Habitualmente se pueden identificar cuatro formas:

Etapa pequeña uninucleada

Forma multinucleada punteada con citoplasma microvacuolado.

Zoosporangio maduro que contiene múltiples y discretas zoosporas esféricas basófilas (2 a 3 μm).

Talo vacío (éstos contienen zoosporas previamente vertidas). Los talos vacíos son, algunas veces, la forma predominante observada en los métodos morfológicos.

La aparición de zoosporangios maduros puede ser confundida con las etapas de vida de un organismo protozoario. Las funciones prácticas más útiles para un diagnóstico morfológico definitivo son:

La presencia de talos vacíos que presenten evidencia de septación interna. Estos son los restos de “talos coloniales” característicos de *Bd*.

Se observan talos con tubos de descarga prominentes que le dan al talo una apariencia de “frasco”.

2.b. Preparación húmeda de frotis, raspado o muda

En general, las muestras de preparación húmeda como frotis, raspado o muda se pueden teñir con Azul algodón de lactofenol (Parker Ink®) y 10% KOH⁽⁴⁷⁾ o Rojo Congo⁽⁴⁸⁾ para ayudar a visualizar las paredes de talos de *Bd*. En este tipo de montaje en fresco las muestras cutáneas pueden ser además esparcidas en un portaobjetos de microscopio, secadas en aire y pintadas con tintes hematológicos tales como Wright's o Wright-Giemsa (Tambien Diff-Quick). Se obtiene una monocapa uniforme de células epidérmicas queratinizadas. Inicialmente se utiliza el objetivo de 100 aumentos para examinar una zona y a continuación el de 400 para confirmar la presencia de esporangios. Los esporangios intracelulares, de forma entre redonda y ovalada, forman agrupaciones en el interior de las células hospedadoras⁽¹⁷⁾.

- En las **larvas** se pueden realizar observaciones en lupa de la región bucal para evaluar además la coloración de la capa epidérmica del disco oral (**Figura 4.10.1**). Se deben seleccionar larvas comprendidas entre los estadios 30 y 41 de Gosner⁽⁴⁹⁾ debido a que la despigmentación causada por la quitridiomycosis en general no es evidente hasta el estadio 30⁽⁵⁰⁾ y las estructuras bucales de las larvas comienzan a modificarse y a perderse a partir del estadio 41 como consecuencia de los cambios que se producen durante la metamorfosis⁽⁴⁹⁾. La observación en fresco se realiza mediante disección del disco oral, de trozos de las filas de “dientes” o de las capas dérmicas, sección que luego se dispone en un portaobjetos, se adiciona 1 o 2 gotas de agua o solución salina y se recubre con un cubreobjetos. Mediante esta técnica de visualización directa se pueden detectar agrupaciones de esporangios⁽¹⁷⁾ que interrumpen el patrón de mosaico de las células epiteliales escamosas.

- En los **juveniles y adultos** se puede observar las mudas de piel, en las que se pueden ver ulceraciones y uno o más esporangios que interrumpen el patrón de mosaico de las células epiteliales escamosas como se describió más arriba (**Figura 4.10.2**).

2.c. Preparación de cortes histológicos

Para el análisis de presencia de *Bd* mediante técnicas histológicas hay que tener en cuenta el estadio de desarrollo en el que se encuentra el individuo (larva, juvenil, adulto) y decidir en función a eso, la parte del cuerpo que se seleccionará para el corte y el proceso de elaboración del taco histológico y la tinción que se utilizará.

2.c.i. Región del cuerpo a seleccionar para los cortes histológicos

- En **larvas** se deben realizar cortes histológicos de una sección de la región bucal (disco oral) que incluya la zona queratinizada de los dentículos y el pico córneo. Pueden ser cortes transversales o longitudinales (**Figura 4.10.3**)⁵¹.

- En **juveniles y adultos** se deben seleccionar parches de piel de los muslos y zona inguinal o dedos como muestra. Esto es debido a que el hongo no está distribuido uniformemente en la superficie del cuerpo, sino que se encuentra con más frecuencia en el estrato córneo presente en los dedos y la porción ventral del cuerpo (particularmente en los muslos y la zona inguinal), siendo menos frecuente en la zona dorsal^(15,16,52). En infecciones severas, los esporangios también pueden detectarse en la superficie dorsal. En infecciones leves, los dedos son el sitio con mayor probabilidad de infección (**Figura 4.10.3**).

2.c.ii. Preparación de los tacos y montaje de las muestras

Para las técnicas histológicas el tejido debe ser conservado en etanol 70% para ser procesado siguiendo el protocolo histológico clásico para Hematoxilina y Eosina (H&E). Para ello, las muestras deben ser fijadas (si es una falange e incluye el hueso, además debe ser descalcificada), deshidratadas en graduaciones crecientes de alcohol e incluidas en parafina. Posteriormente, se debe confeccionar el taco histológico y se debe cortar en secciones de 5 a 7 μm con un micrótopo. Los cortes deben ser montados sobre los portaobjetos, rehidratados, teñidos con H&E y deshidratados nuevamente para su montaje definitivo usando medios de montaje sintéticos, y su posterior observación en el microscopio óptico⁽⁵³⁾.

2.c.iii. Observación en microscopio

Empleando un microscopio óptico y siguiendo el procedimiento propuesto por Berger y col.⁽¹⁸⁾ y Pessier y col.⁽¹⁶⁾ se debe buscar evidencia de *Bd* en el material histológico a través de la observación y detección de esporangios y esporas en sus distintos grados de desarrollo, infectando el epitelio córneo y granuloso de la piel del anfibio (ver descripción de *Bd* en punto 2.a.ii de esta Sección y la **Figura 4.10.3**).

2.d. Métodos de determinación basados en anticuerpos

La inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales contra *Bd* puede ser utilizada para mejorar la sensibilidad de la histología, sobre todo en las infecciones subclínicas⁽⁵⁴⁾. Sin embargo, los anticuerpos que se utilizan reaccionan de manera cruzada con varios hongos, por lo que hay que prestar especial atención a estas técnicas⁽⁵⁵⁾ y usarlas combinadas con microscopía óptica y electrónica como complementos. En este sentido, además, este mé-

todo no se encuentra ampliamente disponible y ya no es tan utilizado dada la alta disponibilidad de los diagnósticos PCR⁽⁴²⁾.

Como una breve referencia a la técnica para la determinación de *Bd* se deben incubar cortes con anticuerpo secundario conjugado a inmunoperoxidasa (IPX), lo cual dará lugar a una tinción roja-marrón de agrupaciones de *Bd* entre las células epiteliales (teñidas mediante tinción de contraste con hematoxilina de Lillie-Mayer⁵⁾ (ver detalles en el manual de OIE¹⁷⁾). Si no se está seguro de tener la parte superficial de la piel -que es donde se encuentra *Bd*- 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⁽⁵⁶⁾. 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 (ver detalles en manual de OIE¹⁷⁾).

2.e. Análisis moleculares

2.e.i. Protocolo para muestras provenientes de hisopados

Para el análisis molecular, primeramente se procede a realizar la extracción de ADN de los hisopos que hasta el momento se encuentran refrigerados. El hisopado puede provenir de individuos vivos o de individuos de colecciones herpetológicas.

En **hisopados provenientes de individuos vivos**, la extracción de ADN puede realizarse fácilmente mediante la utilización del kit comercial Qiagen® (DNeasy Blood & Tissue). Una vez obtenidas las muestras de ADN, se realizan 6 diluciones seriadas 1/10 a partir de la muestra (control positivo) para la construcción de una curva que permita la evaluación de la qPCR y determinación de concentración de muestras incógnitas. Es importante destacar que el número de puntos de las diluciones es relativo a los márgenes de búsqueda de carga de *Bd* que pueden tenerse ya estimados.

Los protocolos a seguir para el análisis de ADN mediante técnica de qPCR, dependen exclusivamente del laboratorio al que se envía la muestra, o del equipo del que se dispone para el análisis según las técnicas estándares de Boyle y col.⁽²⁷⁾ y Garland y col.⁽⁵⁷⁾. A continuación se brinda un protocolo como ejemplo: como primer actividad, se resuspenden y diluyen todos los reactivos según el protocolo de referencia. Se realizan los cálculos de reactivos para preparar una mix para la cantidad de tubos a analizar, de manera de evaluar 5 puntos de la curva standard por triplicado, controles negativos por triplicado y las muestras problema.

Previo a la preparación de la mix, las mesadas y material de trabajo se limpian con NaClO al 5%. Se descongelan las alícuotas de los reactivos utilizados, y se toma el recaudo de proteger la sonda de la luz mediante la utilización de un envoltorio de papel aluminio.

Se colocan 20 µl de mix en cada pocillo de la placa, luego se añade 5 µl de la muestra correspondiente (punto de la curva estándar, muestra problema o control según corresponda), mientras que en los pocillos negativos se coloca 5 µl de agua libre de nucleasas. Posteriormente, se realiza un termociclado de 95 °C durante 20 segundos, luego 50 ciclos de 90 °C durante 1 segundo seguido de 60 °C durante 20 segundos en termociclador StepOnePlus® (Applied Biosystems).

En **hisopados provenientes de individuos de colecciones herpetológicas** fijados en formol y conservados en alcohol, la técnica para extracción de ADN y amplificación puede sufrir algunas variaciones. Es una técnica que se está poniendo a punto. Actualmente se están utilizando dos kits de extracción diseñados específicamente para muestras fijadas con formol: el sistema DNA IQ de Promega® (Madison, WI, EE. UU.: DNA IQ) y DNA FFPE de Machery-Nagel® (Bethlehem, PA, EE.UU.: MN). Estos dos kits se seleccionaron inicialmente para realizar pruebas basándose en comparaciones de costos, facilidad de uso y recursos disponibles de algunos laboratorios. La técnica de DNA IQ aprovecha la carga eléctrica del ADN al capturar y separar ADN en un soporte magnético de 2 o 12 posiciones (un soporte magnético para tubos). La técnica de MN utiliza columnas giratorias de membrana de sílice para aislar y purificar el ADN. El rendimiento de la muestra de MN está limitado por la capacidad y el número de microcentrífugas disponibles para el investigador.

Luego, el ADN extraído se analiza mediante qPCR según las técnicas estándares de Boyle y col.⁽²⁷⁾ y Garland y col.⁽⁵⁷⁾ con algunas optimizaciones menores (para mayores detalles ver Richards-Hrdlicka⁵⁸ y Adams y col.⁵⁹).

En este sentido, es importante destacar que según los estudios realizados hasta ahora, es poco frecuente que las muestras conservadas en un mismo recipiente se contaminen entre sí. Complementariamente, los métodos de extracción de ADN y determinación de presencia de *Bd* en ejemplares de colecciones herpetológicas, pueden proporcionar una dimensión temporal que ayudaría a generar predicciones más poderosas sobre cómo el *Bd* puede afectar a una especie o población hospedadora en las diferentes regiones del planeta.

2.e.ii. Protocolo para análisis a partir de agua filtrada

Para obtener muestras de ADN de *Bd* en agua, los individuos colectados en el campo se deben colocar en recipientes individuales de polipropileno con 150ml de agua estéril (o proporcional, dependiendo del tamaño del animal, de manera de asegurarse de que el 90% del cuerpo del ejemplar quede sumergido para recoger las zoosporas liberadas)⁴³. Luego de 24 hs, tiempo máximo que se ha observado que las zoosporas permanecen activas⁽¹³⁾, se recogen 50 ml de agua de cada recipiente (agitando previamente el agua para evitar el asentamiento de las zoosporas). El agua recogida se filtra repetidamente utilizando una jeringa de 5 ml (Misosa®, Ansan, Corea del Sur) y un filtro de jeringa de 0,2 µm, con filtro de botella estériles⁽⁴⁰⁾ o un papel de filtro de 0,45 µm² ⁽¹⁷⁾. Sobre la muestra de filtrado, el ADN de *Bd* se amplifica mediante la técnica de PCR anidada⁽⁴⁰⁾.

2.e.iii. Protocolo para análisis a partir de agua y sedimento para ADN ambiental

Los filtros se procesan y analizan con los métodos utilizados para hisopos (ver detalles en la presente Sección, punto 2.c.i). Las muestras de sedimento deben ser secadas (preferentemente mediante liofilización por 48 hs). Luego, la materia orgánica seca debe ser homogeneizada y separada en alícuotas de 0,25 gr y esas muestras conservadas en frío a -20 °C hasta la extracción del ADN.

Una particularidad de estas extracciones es que las muestras de ADN ambiental no se diluyen previo al análisis de qPCR. Y para los resultados, las cantidades se expresan en totales (copias de ADN cada 100 ml agua o cada 0,25 g de sedimento, por ejemplo). Los resultados son luego transformados a Log₁₀ para poder comparar las diferentes muestras⁽³⁸⁾.

2.e.iv. Protocolo para análisis a partir de dedos

Para la extracción de ADN de *Bd* a partir de muestras de dedos, se utiliza el dedo entero (en caso de individuos pequeños) o el dedo fraccionado (en caso de dedos grandes). Si es necesario fraccionar, mediante el uso de un bisturí estéril se sacan tiras de piel del dedo, colocando 1 mg de piel en el tubo 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⁽¹⁷⁾ para homogeneizar la muestra, y se procede luego con el mismo protocolo que para los hisopos.

Recomendaciones y Sugerencias

Para todos los estudios vinculados a detección de un agente etiológico causante de una enfermedad, las recomendaciones más importantes tienen que ver con la limpieza de los materiales y espacios de trabajo, relacionado al hecho de evitar contaminación de las muestras. Además, en la búsqueda de este agente en muestreos a campo, las recomendaciones están orientadas hacia la manipulación adecuada de los individuos, la toma de muestra de manera correcta y los protocolos más adecuados para que la misma llegue a su lugar de conservación sin estropearse. A continuación se puntúan una serie de recomendaciones orientadas a colaborar con la tarea de los investigadores que pretenden estudiar *Bd* en anfibios.

Limpiar los materiales de colecta y de manipulación de los individuos entre cada ejemplar (ver **Caja de Texto 4.10.1** para soluciones desinfectantes).

Si se utiliza una red para la captura, se debe tener el recaudo que el quitridio puede adherirse a la red, por lo tanto desinfecte la red entre cada colecta.

Existen preocupaciones acerca de la toxicidad potencial de los guantes de látex para los renacuajos debido a que ciertas sustancias que poseen actúan

Caja 4.10.1 - Protocolos de desinfección de materiales de campo y laboratorio^(17,34,61)

| <i>Propósito</i> | <i>Desinfectante</i> | <i>Concentración</i> | <i>Tiempo</i> |
|---|---|-----------------------------|-------------------|
| <i>Desinfección equipo tipo quirúrgico (pinzas, tijeras, etc.) e instrumental de laboratorio (básculas, calibradores)</i> | <i>Cloruro de Benzalconio</i> | <i>2 mg ml⁻¹</i> | <i>1 min.</i> |
| | <i>Etanol</i> | <i>70%</i> | <i>1 min.</i> |
| <i>Desinfección equipo de colecta y recipientes de colecta</i> | <i>Hipoclorito de sodio (Lavandina doméstica)</i> | <i>4%</i> | <i>15 min.</i> |
| | <i>Secar completamente</i> | | <i>> 3 hs.</i> |
| | <i>Calor</i> | <i>60 °C</i> | <i>30 min.</i> |
| | <i>Calor</i> | <i>37 °C</i> | <i>8 hs.</i> |
| | <i>Permanganato de potasio</i> | <i>1%</i> | <i>10 min.</i> |
| | <i>Esterilización con RUV</i> | <i>1 min.</i> | |
| <i>Desinfección de botas/wader</i> | <i>Hipoclorito de sodio (Lavandina doméstica)</i> | <i>4%</i> | <i>15 min.</i> |
| | <i>Secar completamente</i> | | <i>> 3 hs.</i> |
| <i>Desinfección de prendas o telas usadas en el campo</i> | <i>Agua caliente</i> | <i>> 60 °C</i> | <i>30 min.</i> |

como alérgenos. Es recomendable utilizar guantes de nitrilo para la manipulación. Mayor detalle de las pautas para minimizar estos riesgos se encuentran disponibles en el trabajo de Greer y col.⁽⁶⁰⁾.

No mantener al sol las muestras para análisis moleculares, conservarlas a la sombra y en lo posible en un lugar fresco hasta su traslado al laboratorio.

Los hisopos pueden mantenerse secos a temperatura ambiente (de hasta 23 °C) hasta su refrigeración.

Cuando se trasladen las muestras en vehículo corroborar que no queden en un lugar que se caliente demasiado.

En el caso de muestrear en condiciones demasiado húmedas, se puede colocar el hisopo en etanol al 95% (para evitar proliferación de otros hongos), pero de ser este el caso se recomienda previamente contactarse con el laboratorio que analizará las muestras de ADN ya que en caso de enviarlas de ésta manera se debe contar con un speed vacuum para su procesamiento. En caso de no contar con el mismo, no se recomienda el envío en etanol ya que se podría perder parte de *Bd* en caso de estar presente en el hisopado.

La agrupación o prueba por lotes de hisopos cutáneos de múltiples animales puede realizarse, y se recomienda juntar un máximo de cinco muestras (aunque las débilmente positivas pueden obviarse). Sólo se recomienda juntar los hisopos en los estudios de población cuyo objetivo sea obtener datos de presencia/ausencia en la población o sitio de muestreo⁽⁴³⁾.

Caja 4.10.2 - Pertinencia de los métodos descritos en esta sección para la vigilancia, la detección y el diagnóstico de *Bd*

La clasificación está basada en el éxito de los protocolos en las investigaciones a lo largo del tiempo y en diversas regiones del mundo en relación a sensibilidad, especificidad, disponibilidad y costo (para mayores detalles véase el Manual Acuático de OIE¹⁷). AR: Altamente Recomendado; R: Recomendado; RS: Recomendado en algunas situaciones; NR: No recomendado.

| <i>Técnica</i> | <i>Vigilancia Dirigida</i> | | | <i>Diagnóstico Confirmatorio</i> |
|--|----------------------------|----------------|---------------|----------------------------------|
| | <i>Larva</i> | <i>Juvenil</i> | <i>Adulto</i> | |
| <i>Diagnóstico directo</i> | RS | RS | RS | NR |
| <i>Preparación húmeda (frotis, raspado o muda)</i> | R | R | R | R |
| <i>Técnicas histológicas</i> | R | R | R | RS |
| <i>Métodos de determinación basados en anticuerpos</i> | RS | RS | RS | R |
| <i>Análisis moleculares</i> | AR | AR | AR | AR |

Los métodos preferidos para el almacenamiento de muestras dependerán del tipo de prueba que se realizará. Por ejemplo, el método qPCR Taqman® funciona mejor con muestras de hisopos secados al aire, pero algunos laboratorios que realizan métodos PCR convencionales prefieren hisopos conservados en etanol. Lo mismo sucede con los hisopos, en relación a las opciones de punta (algodón, polietileno, polipropileno) o mango (plástico, madera). Siempre se debe consultar previamente al laboratorio que realizará los análisis como almacenar muestras después de la recolección.

Bibliografía

1. Bosch, J. 2003. Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. Munibe. Donostia- San Sebastián. N° 16.
2. Lips, K.R.; Diffendorfer, J.; Mendelson, J.R. & Sears, M.W. 2008. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biology* 6: e72.
3. Pedersen, A.B.; Jones, K.E.; Nunn, C.L. & Altizer, S. 2007. Infectious diseases and extinction risk in wild mammals. *Conservation Biology* 21: 1269-1279.
4. Lavilla, E.O. 2008. Declinaciones Poblacionales y Extinciones en Anfibios de Argentina. Anticipo de Anales de la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires. Argentina.
5. Beldomenico, P.M. & Begon, M. 2009. Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles?. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 21-27.
6. Smith, K.G.; Acevedo-Whitehouse, K. & Pedersen, A.B. 2009. The role of infectious diseases in biological conservation. *Animal Conservation* 12: 1-12.
7. Vredenburg, V. T.; Knapp, R.A.; Tunstall, T. & Briggs, C.J. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 9689-9694.
8. Ghirardi, R.; Levy, M.G.; López, J.A.; Steciow, M.M. & Perotti, M.G. 2014. *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting anurans in a protected area from Santa Fe province, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* 28: 29-31.
9. Ghirardi, R.; Levy, M.G.; López, J.A.; Corbalán, V.; Steciow M.M. & Perotti M.G. 2014. Endangered amphibians infected with the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in austral temperate wetlands from Argentina. *Herpetological Journal* 24: 129-133.
10. Solís, R.; Penna, M.; De la Riva, I.; Fisher, M.C. & Bosch, J. 2015. Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in anurans from the Andes highlands of northern Chile. *Herpetological Journal* 24: 55-59.
11. Whitfield, S.M.; Lips, K.R. & Donnelly, M.R. 2016. Amphibian decline and conservation in Central America. *Copeia* 2016: 351-379.
12. Scheele, B.C.; Foster, C.N.; Hunter, D.A.; Lindenmayer, D.B. & Hear, G.W. 2019. Living with the enemy: Facilitating amphibian coexistence with disease. *Biological Conservation* 236: 52-59.
13. Longcore, J.C.; Pessier, A.P. & Nichols, D.K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91: 219-227.
14. Letcher, P.M.; Powell, M.J.; Churchill, P.F. & Chambers, J.G. 2006. Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota). *Mycological Research* 110: 898-915.
15. Berger, L.; Speare, R.; Daszak, P.; Green, D.E.; Cunningham, A.A.; Goggin, C.L.; Slocombe, R.; Ragan, M.A.; Hyatt, A.D.; McDonald, K.R.; Hines, H.B.; Lips, K.R.; Marantelli, G. & Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rainforests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9031-9036.
16. Pessier, A.P.; Nichols, D.K.; Longcore, J.E. & Fuller, M.S. 1999. Cutaneous chytridiomycosis

- in poison dart frogs (*Dendrobates spp.*) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11: 194-199.
17. OIE. 2012. Manual Acuático. Capítulo 2.1.1. www.oie.int. Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2011.
 18. Berger, L.; Speare, R. & Kent, A. 1999. Diagnosis of Chytridiomycosis in Amphibians by Histologic Examination. Disponible en: <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/histo/chhisto.htm>.
 19. Green, D.E & Sherman, C.K. 2001. Diagnostic histological findings in Yosemite toads (*Bufo canorus*) from a die-off in the 1970s. *Journal of Herpetology* 35: 92-103.
 20. Weldon, C. & Du Preez, L.H. 2006. Quantitative measurement of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian skin. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 153-161.
 21. Berger, L.; Hyatt, A.D.; Speare, R. & Longcore, J.E. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 51-63.
 22. Berger, L.; Marantelli, G.; Skerratt, L.F. & Speare, R. 2005. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 47-50.
 23. Berger, L.; Speare, R. & Hyatt, A. 1999. Chytrid Fungi and Amphibian Declines: Overview, Implications and Future Directions. En: Campbell, A. (ed.). *Declines and Disappearances of Australian Frogs*. Biodiversity Group Environment Australia, Canberra.
 24. Nichols, D.K.; Pessier, A.P. & Longcore, J.E. 1998. Cutaneous chytridiomycosis: an emerging disease? *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians* 1998: 269-271.
 25. Carey, C.; Cohen, N. & Rollins-Smith, L. 1999. Amphibian declines: An immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 459-472.
 26. Burrowes, P.A.; Joglar, R.L. & Green, D.E. 2004. Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica* 60: 141-154.
 27. 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. *Diseases of Aquatic Organisms* 60:141-148.
 28. 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.
 29. Lips, K.R.; Green, D.E. & Papendick, R. 2003. Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *Journal of Herpetology* 37: 215-218.
 30. Annis, S.L.; Dastor, F.P.; Ziel, D.; Daszak, P. & Longcore, J.E. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases* 40: 420-428.
 31. Livo, L.J. 2004. Methods for Obtaining *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) Samples for PCR Testing. Department of Integrative Physiology, University of Colorado.
 32. Kriger, K.M.; Hero, J.M. & Ashton, K.J. 2006. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 71: 149-154.
 33. Kriger, K.M.; Hines, H.B.; Hyatt, A.D.; Boyle, D. & Hero, J.M. 2006. Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 71: 141-148.
 34. Retallick, R.W.R.; Miera, V.; Richards, K.L.; Field, K.J. & Collins, J.P. 2006. A non-lethal technique for detecting the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 77-85.
 35. Brem, F.M. & Lips, K.R. 2008. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection patterns among Panamanian amphibian species, habitats and elevations during epizootic and enzootic. *Diseases of Aquatic Organisms* 81: 189-202.
 36. Kirshtein, J.D.; Anderson, C.E.; Woods, J.S.; Longcore, J.E. & Voytek, A. 2007. Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* from sediments and water. *Diseases of Aquatic Organisms* 77: 11-15.
 37. Barnes, M.A.; Brown, A.D.; Daum, M.N.; de la Garza, K.A.; Driskill, J.; Garrett, K.; Godstein, M.S.; Luk, A.; Maguire, J.I.; Moke, R.; Ostermaier, E.M.; Sanders, Y.M.; Sandhu, T.; Stith, A. & Suresh, V.V. 2020. Detection of the Amphibian pathogens chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and Ranavirus in West Texas, USA, using environmental DNA. *Journal of Wildlife Diseases* 56: 702-706.

38. Branelly, L.A.; Wetzel, D.P.; Ohmer, M.E.B.; Zimmerman, L.; Saenz, V. & Richards-Zawacki, C.L. 2020. Evaluating environmental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. *Oecologia* 194: 267-281.
39. Soto-Azat, C.; Clarke, B.T.; Poynton, J.C. & Cunningham, A.A. 2009. Widespread historical presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in African pipid frogs. *Diversity and Distributions* 2009: 1-6.
40. Shin, J.; Bataille, A.; Kosch, T.A. & Waldman, B. 2014. Swabbing often fails to detect amphibian chytridiomycosis under conditions of low infection load. *PLoS ONE* 9: e111091.
41. Berger, L.; Longcore, J.E.; Speare, R.; Hyatt, A. & Skerratt, L.F. 2009. Fungal Diseases in Amphibians. *En: Heatwole, H. & Wilkinson, J.W. (eds.). Amphibian Biology, Amphibian Decline: Disease, Parasites, Maladies, and Pollution.* Surrey Beatty & Sons, NSW, Australia.
42. Pessier, A.P. & Mendelson, J.R. (eds.) 2017. A Manual for Control of Infectious Diseases in Amphibian Survival Assurance Colonies and Reintroduction Programs. Ver. 2.0. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group: Apple Valley, MN.
43. Hyatt, A.D.; Boyle, D.G.; Olsen, V.; Boyle, D.B.; Berger, L.; Obendorf, D.; Dalton, A.; Kriger, K.M.; Hero, M.; Hines, H.; Phillott, A.D.; Campbell, R.; Marantelli, G.; Gleason, F.H. & Colling, A. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 73: 175-192.
44. Miaud, C.; Arnal, V.; Poulain, M.; Valentini, A. & Dejean, T. 2019. eDNA increases the detectability of ranavirus infection in an alpine amphibian population. *Viruses* 11: 526.
45. Spitzen-van der Sluijs, A.; Stark, T.; Dejean, T.; Verbrugghe, E.; Herder, J.; Gilbert, M.; Janse, J.; Martel, A.; Pasmans, F.; Valentini, A. 2020. Using environmental DNA for detection of *Batrachochytrium salamandrivorans* in natural water. *Environmental DNA* 2: 565-571.
46. Branelli, L.A.; Wetzel, D.P.; Ohmer, M.E.B.; Zimmerman, L.; Saenz, V. & Richards-Zawacki, C.L. 2020. Evaluating environmental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. *Oecologia* 194: 267-281.
47. Mazzoni, R.; Cunningham, A.A.; Daszak, P.; Apolo, A.; Perdomo, E. & Speranza, G. 2003. Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infectious Diseases* 9: 995-998.
48. Briggs, C. & Burgin, S. 2004. Congo Red, an effective stain for revealing the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in epidermal skin scrapings from frogs. *Mycologist* 18: 98-103.
49. Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
50. Knapp, R.A. & Morgan, J.A.T. 2006. Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. *Copeia* 2006: 188-197.
51. Fellers, G.M.; Green, D.E. & Longcore, J. 2001. Oral chytridiomycosis in the mountain yellow legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia* 2001: 945-953.
52. Arellano, M.L. 2012. Susceptibilidad y sensibilidad de algunas especies de anuros a la infección por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
53. Humason, G.L.; Presnell, J.K. & Schreibman, M.P. (eds.). 1997. Humason's Animal Tissue Techniques (fifth ed.), The John Hopkins University Press, Baltimore.
54. Van Ells, T.; Stanton, J.; Strieby, A.; Daszak, P.; Hyatt, A.D. & Brown, C. 2003. Use of immunohistochemistry to diagnose chytridiomycosis in dyeing poison dart frogs (*Dendrobates tinctorius*). *Journal of Wildlife Diseases* 39: 742-745.
55. Berger, L.; Hyatt, A.D.; Speare, R. & Longcore, J.E. 2005. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 51-63.
56. 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. *Diseases of Aquatic Organisms* 61: 85-88.
57. Garland, S.; Baker, A.; Phillott, A.D.; Skerratt, L.F. 2010. BSA reduces inhibition in a TaqMan® assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 92: 113-116.
58. Richards-Hrdlicka, K.L. 2012. Extracting the amphibian chytrid fungus from formalin-fixed specimens. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 842-849.

59. Adams, A.J.; La Bonte, J.P.; Ball, M.L.; Richards-Hrdlicka, K.L.; Toothman, M.H. & Briggs, C.J. 2015. DNA extraction method affects the detection of a fungal pathogen in formalin-fixed specimens using qPCR. *PLoS ONE* 10: e0135389.
60. Greer, A.I.; Schock, D.M.; Brunner J.M.; Johnson, R.; Picco, A.M.; Cashins, S.D.; Alford, R.; Skerratt, L.F. & Collins, J.P. 2009. Guidelines for the safe use of disposable gloves with amphibian larvae in light of pathogens and possible toxic effects. *Herpetological Review* 40: 145-147.
61. Perotti, M.G. & Ghirardi, R. 2010. Disposición 000774 de PN sobre "Como desinfectar el material de campo cuando se trabaja en humedales". Ministerio de Turismo, Administración de Parques Nacionales.