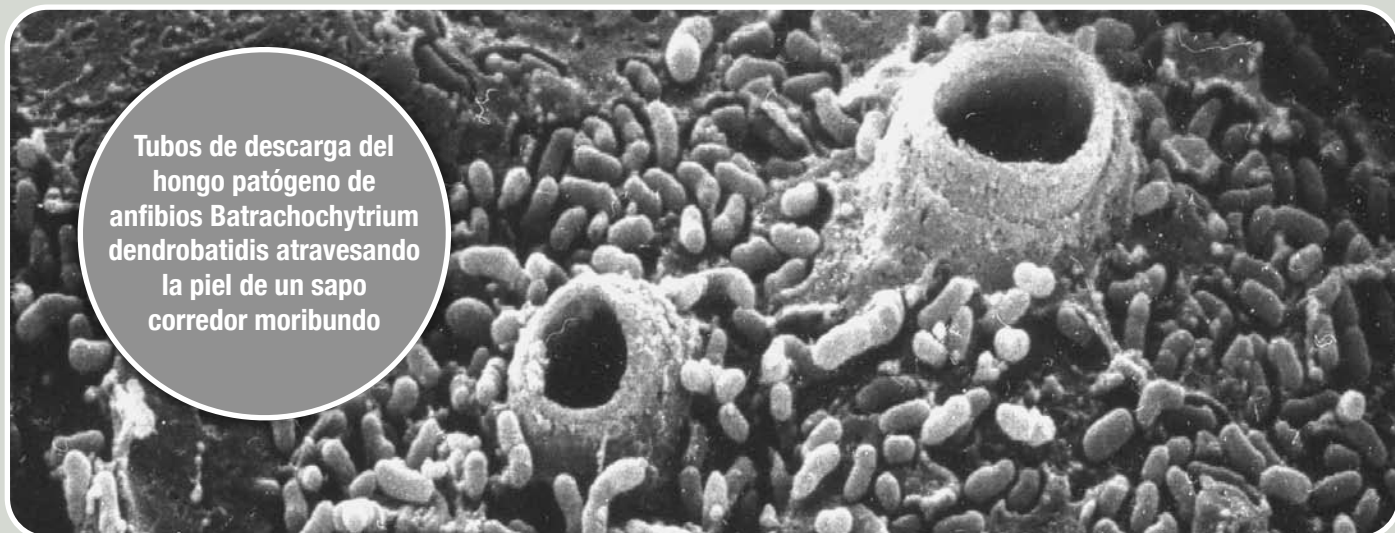


ENFERMEDADES EMERGENTES EN ANFIBIOS: LA GRAN AMENAZA DE LA BIODIVERSIDAD

I CONVOCATORIA
DE AYUDAS A LA
INVESTIGACIÓN
EN BIOLOGÍA DE
LA CONSERVACIÓN
(2003)

Tubos de descarga del
hongo patógeno de
anfibia *Batrachochytrium*
dendrobatidis atravesando
la piel de un sapo
corredor moribundo



MEMORIA CIENTÍFICA

Grado de cumplimiento de los objetivos iniciales del proyecto y resultados alcanzados

En esta memoria científica se indica el grado de cumplimiento de los objetivos iniciales del proyecto, y se resumen los resultados mas significativos alcanzados para cada uno de estos objetivos. No hemos pretendido recoger todos y cada uno de los resultados obtenidos dado que estos están siendo publicados en revistas científicas especializadas, sino por el contrario exponer, lo mas brevemente y didacticamente posible, los logros alcanzados por el proyecto.

El objetivo general de este proyecto era contribuir al conocimiento de las enfermedades emergentes en anfibios (fundamentalmente quitridiomycosis) aunando los esfuerzos de investigadores de distintos países con el propósito de encontrar, en un futuro próximo, algún

método paliativo que salve de la extinción a multitud de especies de anfibios en todo el mundo.

La importancia del trabajo en equipo en este problema medioambiental es capital dado que, por un lado, se trata de un problema extraordinariamente complejo que necesita la dedicación de un equipo multidisciplinar que integre conocimientos de muchas materias de la biología y, por otro, se trata de un amenaza muy seria para la supervivencia de miles de especies de anfibios en todo el mundo que podrían desaparecer si nuestros conocimientos sobre este problema no crecen de forma exponencial en los años próximos.



Sapo partero común (*Alytes obstetricans*)

Los sapos parteros son los anfibios de España mas susceptibles a la acción del hongo patógeno

ZONAS CALIENTES



Localidades con presencia del hongo patógeno en España y Europa

España es, actualmente, el país de Europa donde mejor se conoce la distribución del hongo patógeno. La isla de Mallorca, y concretamente la Sierra de Tramontana, es una de la zonas calientes dado que alberga una de las especies de anfibio mas amenazadas del mundo

Conocimiento de la incidencia de la quitridiomycosis

En primer lugar, el proyecto ha proporcionado un mayor conocimiento sobre la situación real de la incidencia de quitridiomycosis en las áreas geográficas estudiadas. Entre otros resultados, el proyecto ha determinado que España podría ser el país europeo con mayor incidencia de enfermedades emergentes de anfibios. Actualmente, España es el país europeo en el que mejor conocemos la distribución del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis*, como consecuencia de los intensos muestreos que hemos realizado en todo el país en los últimos 3 años, y que han hecho que el volumen de muestras analizadas de España sea muy superior al estudiado en toda Europa. Además, estos muestreos por todo el país han hecho que hayamos identificado sitios donde resulta especialmente significativo y preocupante la presencia del hongo, como es el caso de la isla de Mallorca, donde se encuentra una de las especies de anfibios mas amenazadas del mundo.

Por otro lado, gracias al proyecto de investigación hemos determinado la situación en áreas geográficas remotas de las que no poseíamos información alguna. Este es el caso de las zonas limítrofes de Chile, Perú y Bolivia, que albergan una interesante comunidad de anfibios en continuo crecimiento a medida que se suceden los estudios taxonómicos y se describen nuevas especies y que, sin embargo, podría estar desapareciendo a un ritmo aún mayor por acción de las enfermedades emergentes. Por otro lado, el proyecto también ha servido para poner de manifiesto que el fenómeno de las enfermedades emergentes de anfibios es un fenómeno complejo en el que hay varios agentes implicados. Así, el estudio de varios episodios de mortalidad masiva de anfibios en el suroeste de India nos ha permitido constatar que el hongo patógeno podría no ser el único responsable de los declives generalizados de anfibios, siendo, probablemente los virus específicos de anfibios los responsables de los fenómenos registrados.



Macho de sapo partero balear

Conocimiento de la biología del hongo patógeno

En segundo lugar, el proyecto ha proporcionado un mayor conocimiento de la biología de hongo patógeno causante de la quitridiomycosis. Este avance contribuirá, sin duda, a la obtención de métodos para paliar la enfermedad en un futuro próximo.

Así por ejemplo, y gracias al proyecto, hemos podido determinar que la temperatura juega un papel muy relevante en la virulencia del hongo, de modo que en muchas localizaciones la llegada del hongo podría no estar exactamente correlacionada con la aparición de mortalidades masivas de anfibios. Los resultados obtenidos en nuestras investigaciones indican que en muchas zonas de latitudes templadas la acción devastadora del hongo podría estar produciéndose de forma poco conspicua tras su introducción, reduciendo el tamaño de las poblaciones de anfibios al ir eliminado ejemplares

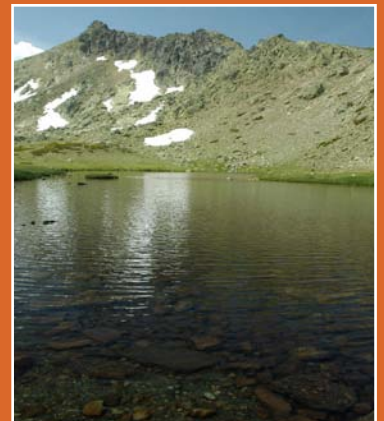
lentamente. Por el contrario, y solo cuando las condiciones ambientales alcanzan las condiciones óptimas de crecimiento del hongo, y en el medio se encuentran determinadas especies de anfibios altamente susceptibles, se podrían desencadenar mortalidades masivas espectaculares, existiendo así un asincronismo entre la llegada del hongo a una determinada localidad y los fenómenos espectaculares de mortalidades masivas que estamos observando recientemente.

Por otro lado, y una vez más, comprobamos cómo las amenazas que se ciernen sobre los anfibios actúan de forma sinérgica. Ahora sabemos que el calentamiento global, cuyos efectos en nuestras latitudes son especialmente graves en las zonas altas de montaña, podría estar contribuyendo a aumentar la virulencia del hongo en las zonas de montaña, haciendo que ahora se alcancen las temperaturas óptimas que el hongo patógeno precisa para su crecimiento.

Las
montañas ya
no son seguras
para los
anfibios



CAMBIO GLOBAL



Subida de las temperaturas

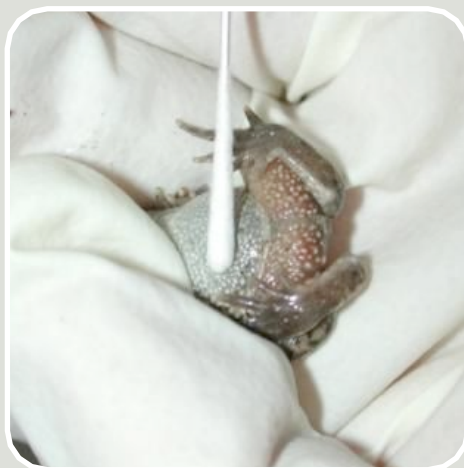
La subida de las temperaturas en las zonas altas de montaña podría estar proporcionando en los últimos años las condiciones idóneas para el desarrollo del hongo patógeno y, por tanto, aumentando su virulencia y desencadenando mortalidades masivas de anfibios.

Metodologías de trabajo

En tercer lugar, el proyecto ha proporcionado varias metodologías de trabajo útiles para el estudio de la quitridiomycosis. Así por ejemplo, y gracias al proyecto, hemos puesto a punto el primer método en el mundo, que sirve no solo para determinar la presencia del hongo patógeno en el medio sin la necesidad de analizar los anfibios presentes, sino también para cuantificar la cantidad de zoosporas por volumen de agua. Además, también hemos desarrollado una metodología de análisis de la prevalencia de la infección que ha proporcionado datos comparables entre distintas localidades muy interesantes, utilizando para ello una especie de anfibio ampliamente distribuido en Europa y altamente sensible a la acción del hongo. Estas dos metodologías están siendo

usadas ya por investigadores de otros países, y se han convertido en herramientas estándares en el estudio de la incidencia de la enfermedad en las zonas altas de Europa.

**Cuantificación
de zoosporas
presentes en el
medio**



Objetivos concretos y grado de cumplimiento

A continuación se detallan el grado de cumplimiento, y los resultados mas significativos alcanzados, para cada uno de los objetivos concretos iniciales del proyecto.

OBJETIVO 1.



Enfermedades emergentes

Una enfermedad emergente es aquella de reciente aparición, o cuyo rango geográfico se ha incrementado mucho en los últimos años. La quitridiomycosis está ya presente en casi todo el mundo, aunque aún no conocemos en detalle las zonas de incidencia.



Determinación de las zonas de incidencia de la quitridiomycosis en los países objeto de estudio.

Gracias al proyecto de investigación hemos podido determinar la incidencia de la quitridiomycosis en amplias zonas geográficas del mundo. En España hemos demostrado que el hongo patógeno se encuentra ampliamente distribuido, mucho más de lo esperado cuando iniciamos el proyecto. En ese momento, partíamos del supuesto de que en España el patógeno había sido introducido recientemente y, por lo tanto, suponíamos que sería posible determinar los patrones de dispersión rápida del patógeno en forma de frentes epidémicos.

Además, hemos podido constatar que el hongo patógeno se encuentra ampliamente distribuido por Europa, aumentando de forma significativa la lista de países europeos donde el patógeno está presente. Los resultados obtenidos sobre la incidencia de la enfermedad en Europa han sido difundidos en trabajos como el publicado en la prestigiosa revista **Emerging**

Infectious Disease, así como en multitud de charlas y seminarios en distintos foros científicos.

La incidencia en el resto de países objeto de estudio ha sido ya analizada, y la difusión de los resultados obtenidos se ha realizado ya en diferentes foros científicos y se encuentra en fase de publicación.

Entre otros, conviene destacar los resultados obtenidos en Cuba, donde hemos encontrado el hongo patógeno en las regiones occidental, central y oriental, desde el nivel del mar hasta los 1385 m de altitud, pero siempre en la vertiente caribeña del país. Curiosamente, el foco principal de infección que hemos detectado se encuentra en una zona muy antropizada en la Sierra de Banao, un macizo montañoso próximo a Topes de Collantes, el único sitio donde otros investigadores hallaron en octubre de 2006 un ejemplar moribundo que resultó ser el primer caso conocido de quitridiomycosis en la isla.

En Chile, la presencia del patógeno aparece asociada a los focos de introducción de una especie

Nuestro conocimiento ha crecido mucho en los últimos años

exótica introducida, un sapo de uñas del género *Xenopus*, en centro-norte del país.

En Perú y Bolivia, hemos podido constatar la presencia del patógeno en las zonas altas de los Andes, donde su incidencia podría ser mucho mas dramática a juzgar por el elevado número de localidades donde, presumiblemente, hemos constatado extinciones locales de poblaciones de anfibios durante los trabajos de campo. Además, resultan muy elocuentes los testimonios de la población local de diferentes valles andinos que recogimos durante los trabajos de campo, y que indefectiblemente coincidieron en la gran mortalidad de anfibios observada entre dos y cuatro años atrás, y que afectó probablemente a las formas forestales del género *Telmatobius* y a ciertos bufónidos.

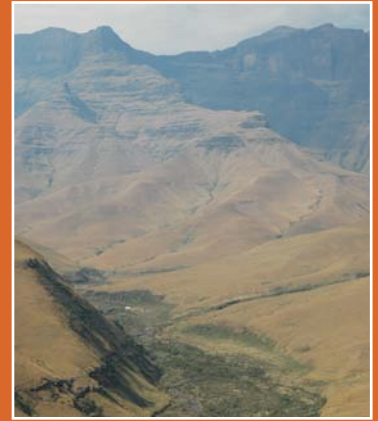
En India, resulta sorprendente como, pese a haber registrado durante nuestros trabajos de campo los primeros casos de mortalidades masivas de anfibios motivados, sin

duda por alguna enfermedad específica de anfibios, no hemos encontrado una relación causal con el hongo patógeno.

A nivel global, hemos considerado primordial difundir los resultados obtenidos en el proyecto a través de una herramienta que pudiera ser útil para toda la comunidad científica internacional. La página web www.spatialepidemiology.net/bd, cuyo desarrollo corre a cargo del Dr. Fisher, responsable del proyecto en Inglaterra, se ha convertido en la principal base de datos a nivel mundial sobre quitridiomycosis, tras su exitosa presentación en el congreso mundial sobre la incidencia de la enfermedad desarrollado recientemente en Tampa (Florida, EEUU). Tan sólo un mes después de su lanzamiento (noviembre de 2007) hemos incorporado en esta base de datos los resultados obtenidos en España, mientras que los resultados del resto de los países se incorporarán en breve.

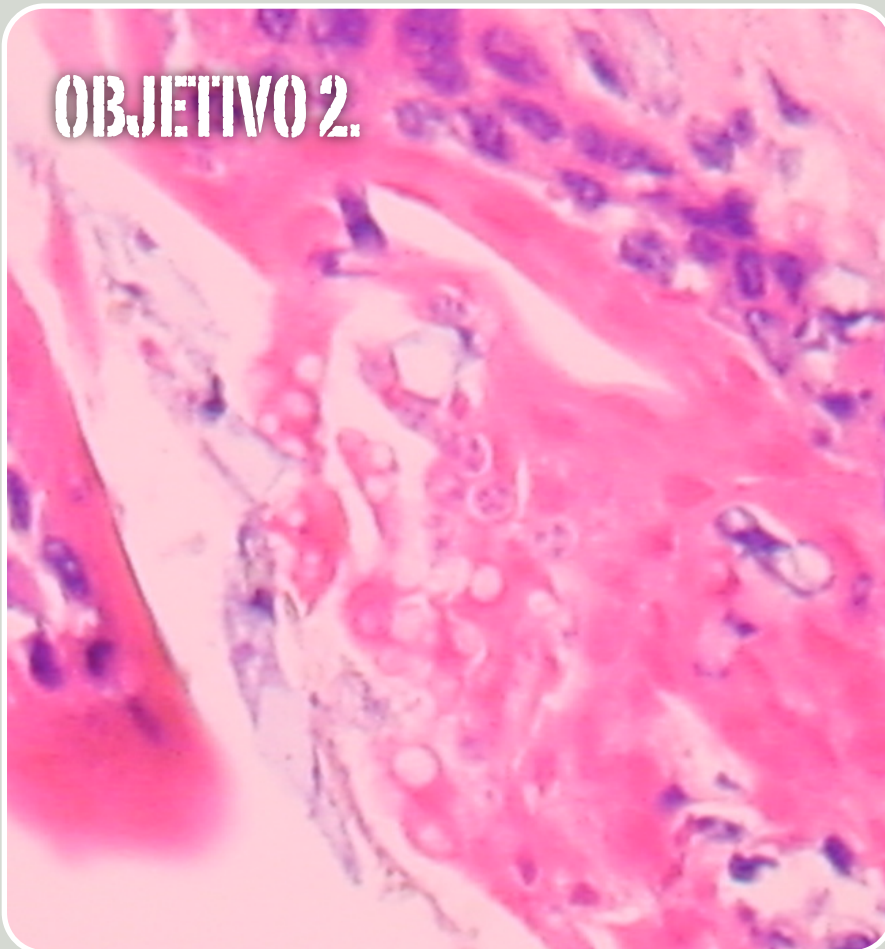


MORTALIDADES MASIVAS DE ANFIBIOS



Durante el desarrollo del proyecto hemos constatado la incidencia de las enfermedades emergentes de anfibios en amplias zonas geográficas, desde Sudáfrica a India, pasando por Perú o Cuba.

OBJETIVO 2.



Origen de la quitridiomycosis

La hipótesis mas aceptada sobre el origen de la enfermedad es que ésta es originaria del sur de África, desde donde habría sido diseminada a todo el mundo a través del comercio internacional de ranas para investigación desde hace décadas.



Determinación de las épocas de introducción del patógeno en las áreas objeto de estudio.

La determinación de la introducción del patógeno en las áreas de estudio es otro factor que considerábamos clave al inicio del proyecto. La posibilidad de determinar la presencia del hongo patógeno en ejemplares de colecciones científicas colectados en épocas anteriores es una herramienta extremadamente útil. Sin embargo, dado que todo el material antiguo disponible se encuentra fijado en formol, su análisis no puede realizarse mediante técnicas moleculares y son necesarias técnicas de histología básica muy laboriosas y muy poco potentes.

Los resultados mas significativos obtenidos en este apartado han sido, quizás, los obtenidos con el análisis de mas de 1000 ejemplares de colecciones científicas de España. Así, se han preparado miles de preparaciones histológicas con material de distintas localidades en las que la presencia actual del hongo patógeno ha sido constatada por métodos moleculares. Para cada localidad, y en función del material disponible,

se han seleccionado las especies mas susceptibles a la quitridiomycosis y los ejemplares colectados en distintas épocas cuando era posible.

Desgraciadamente, todo el ingente trabajo realizado con este material no ha servido para constatar la presencia del patógeno en épocas pasadas en las localidades estudiadas. Una posible explicación de los resultados negativos obtenidos sería la ausencia del patógeno en épocas antiguas en las localidades estudiadas y, por tanto, la constatación de que el hongo patógeno habría sido

introducido recientemente en las zonas donde ahora está presente.

Sin embargo, estos resultados negativos no permiten descartar la explicación alternativa de que no hemos detectado el hongo patógeno por la combinación de distintos factores como son: a) la baja potencia de la técnica utilizada, b) la bajísima prevalencia de la infección esperada en épocas antiguas, y c) lo reducido

El análisis de ejemplares de colección puede ser de gran utilidad

EL HONGO EN MALLORCA



La introducción del hongo causante de la quitridiomycosis en Mallorca pudo tener lugar a principios de los 90 mediante el programa de reintroducción del sapo partero balear, cuando aun la comunidad científica desconocía la existencia de este organismo patógeno.

del material analizado dado el material disponible. Así por ejemplo, hay que señalar que con una prevalencia de la infección menor del 4% (que hemos determinado en muchas poblaciones usando métodos moleculares altamente sensibles) sería necesario el análisis de hasta 60 ejemplares por localidad y fecha de colecta para poder determinar con rotundidad la ausencia del hongo patógeno, lo que desgraciadamente resulta imposible con el material antiguo de colecciones del que disponemos.

Sin embargo, nuestro trabajo con material antiguo de ejemplares encontrados muertos hace tiempo, sin causas evidentes, ha arrojado resultados mucho mas interesantes. Este es el caso de los trabajos que hemos realizado con el sapo partero balear (*Alytes muletensis*) en Mallorca, y para el que hemos analizado todos los ejemplares antiguos que se conservan en distintas colecciones. Los resultados obtenidos en este caso fueron muy sorprendentes, y han constatado que, muy probablemente, la introducción del patógeno en Mallorca se produjo irónicamente como consecuencia del programa de reintroducción de la especie en la isla a principios de los años 90.

En efecto, los análisis que hemos realizado de varios ejemplares que murieron

inexplicablemente durante el programa de cría en cautividad que tuvo lugar en el Zoo de Jersey por la prestigiosa organización conservacionista Durrell Wildlife Trust, indican que el patógeno se encontraba presente en sus instalaciones. No obstante, conviene señalar aquí, que en esos años la comunidad científica aún desconocía la existencia del hongo patógeno y de la enfermedad que produce. Mas aún, los análisis que hemos realizado con este material indican que la posible vía de infección de los animales usados en el programa de cría del sapo partero balear fue una partida de ejemplares del género *Xenopus*. Estos ejemplares, procedentes de Africa y con toda probabilidad portadores del hongo patógeno, fueron desafortunadamente mantenidos en las mismas instalaciones del Zoo junto con los ejemplares de sapo partero que luego fueron liberados en Mallorca.

Estos resultados, que indican no sólo la época, sino también la posible vía de introducción del hongo patógeno en una zona geográfica, constituía el caso mejor conocido a nivel mundial sobre la dispersión de la quitridiomycosis, y esperamos que sea publicado en los próximos meses en una revista científica de alto impacto.



OBJETIVO 3.



Dispersión del patógeno

Como en cualquier enfermedad infecciosa, la mejor forma de luchar contra la quitridiomycosis es evitar su propagación. Sólo conociendo en profundidad los patrones de dispersión del hongo patógeno podremos llegar a evitar la pandemia.



Análisis de patrones de dispersión de la enfermedad.

Dado el carácter introducido del hongo patógeno de anfibios, uno de los aspectos claves para entender la incidencia de la enfermedad y poder encontrar métodos de control, es el conocimiento de los patrones de dispersión del patógeno.

Gracias al proyecto de investigación hemos encontrado algunos patrones de dispersión en distintas áreas y escalas geográficas.

Quizás, los casos mas interesantes encontrados sean, además del comentado previamente sobre la introducción del hongo en Mallorca vía el programa de reintroducción del sapo partero balear, los observados en Chile y en el Parque Natural de Peñalara en Madrid. La comparación de ambos casos resulta muy interesante, ya que estos difieren tanto en la escala geográfica de actuación (desde pocos kilómetros en Peñalara hasta centenares de kilómetros en el centro de Chile), como en el vector dispersor actual del patógeno.

A una escala espacial reducida, en Peñalara hemos podido documentar el que sería el primer efecto indirecto

conocido de la enfermedad a nivel mundial. Tras la casi total extinción del sapo partero común (*Alytes obstetricans*) en el parque entre los años 1997 y 1999, en los últimos años hemos podido determinar la expansión del sapo común (*Bufo bufo*). Curiosamente, el sapo

común se ha beneficiado de la desaparición del sapo partero, ya que ha tenido acceso a las masas de agua que años antes ocupaba aquel. Este hecho se explica por que las larvas de sapo común no pueden competir con las larvas de sapo partero, dadas las peculiaridades de la biología de ambas especies y los escasos recursos tróficos de las charcas del parque.

Desgraciadamente, el sapo común, aunque muestra una mayor resistencia a la enfermedad, es un hospedador ideal para el hongo patógeno, por lo que su reciente expansión ha motivado no solo la dispersión del hongo a zonas nuevas, sino su permanencia en aquellas donde la desaparición del sapo partero común podría haber comprometido la supervivencia del hongo. Este interesante patrón de dispersión de la enfermedad, vía movimientos naturales de anfibios, está siendo publicado

El hombre
ha propagado el
hongo patógeno por
todo el mundo

en la revista **Diversity & Distributions**, y constituye uno de los escasos ejemplos documentados en el mundo.

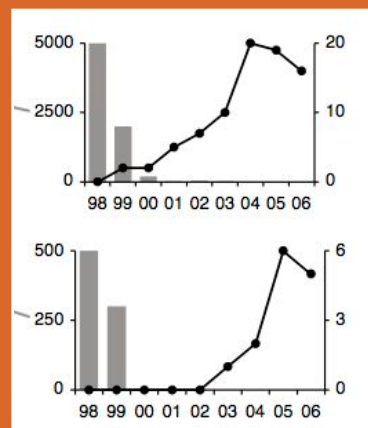
Por otro lado, los estudios que hemos realizado en Chile determinan que la presencia del hongo patógeno se halla limitada, por ahora, a las poblaciones introducidas de la rana de uñas (*Xenopus laevis*) localizadas en el centro-norte del país. La constatación de que el hongo se encuentra presente en todas y cada una de las poblaciones de *Xenopus* conocidas en Chile, y que sin embargo los anfibios autóctonos de las zonas cercanas no presentan aún síntomas de infección, es especialmente interesante. Las elevadas distancias geográficas entre las distintas poblaciones de la rana de uñas, y sus hábitos muy

acuáticos, indican, al contrario que en el caso del sapo común de Peñalara, que la dispersión del hongo en este caso está directamente mediada por la mano del hombre. Por lo tanto, el patrón observado en Chile es especialmente relevante para conocer, en los próximos años, la dispersión de la enfermedad a los anfibios autóctonos, por lo que uno de nuestros objetivos planteados para el futuro es el estudio, mas detallado, de las zonas cercanas a los puntos de introducción que hemos detectado con el proyecto.

En Chile el hongo está presente en todas las poblaciones introducidas de anfibios



PEÑALARA



Vectores involuntarios de transmisión del hongo

El sapo común se ha convertido en el mejor aliado del hongo en el Parque Natural de Peñalara, dispersando el patógeno por toda la zona y permitiendo su supervivencia incluso después de que muchas charcas quedasen vacías por la acción devastadora del hongo.

OBJETIVO 4.

Temperatura y virulencia

La temperatura se ha revelado como un factor clave para el desarrollo de la quitridiomycosis. El hongo patógeno soporta un amplio rango de temperaturas, pero sólo cuando se encuentra dentro de un rango óptimo de temperaturas resulta letal para los anfibios.



Análisis de las características ecológicas mas favorables para el establecimiento y dispersión de la quitridiomycosis.

Uno de los resultados mas interesantes que ha producido el proyecto es, sin duda, la constatación de que las condiciones medioambientales pueden resultar determinantes a la hora de desencadenar los brotes de quitridiomycosis.

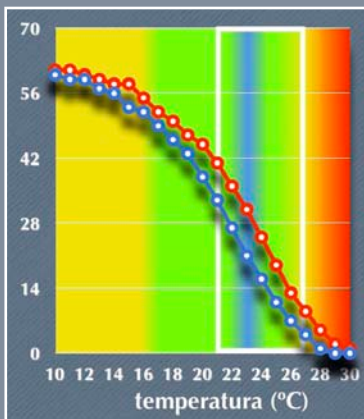
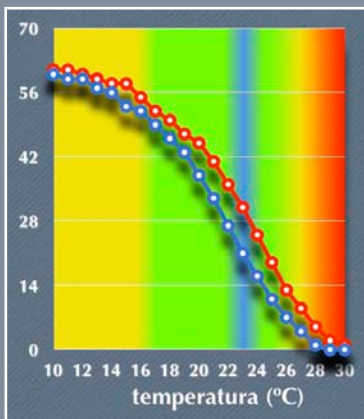
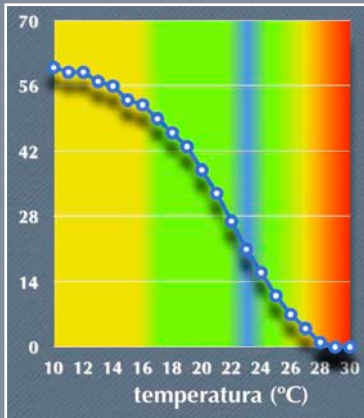
En el trabajo que publicamos en la prestigiosa revista *Proceedings of the Royal Society*, demostramos como las mortalidades masivas de anfibios que se iniciaron en 1997 en Peñalara estaban ligadas a cambios medioambientales drásticos en la zona. Varias variables medioambientales recogidas en la zona mostraron una variación significativa antes y después de las mortalidades masivas. Por ejemplo, el número de días al mes soleados y calientes, entre otras variables relacionadas con la temperatura, experimentó un crecimiento consistente con el patrón global de incremento de la temperatura observado en gran parte del planeta. Además, demostramos como los patrones observados en la zona

El cambio global está modulando la enfermedad

mediante el análisis de las variables meteorológicas recogidas a nivel del suelo se correspondían con patrones generales de circulación de las capas altas de la atmósfera, como es la Oscilación del Atlántico Norte. Por otro lado, también demostramos que las desviaciones en la temperatura media superficial en la

zona habían alcanzado su valor máximo en 1996, esto es, justo antes de que se produjesen las primeras mortalidades masivas en la zona.

El análisis detallado a menor escala de la evolución de las temperaturas en la zona mostró una relación aun mayor con las características de la biología del hongo causante de la quitridiomycosis. Así, analizamos el comportamiento de las temperaturas máximas registradas durante el período del año en el que las especies afectadas experimentan mayores mortalidades, esto es, durante los meses de verano cuando completan la metamorfosis. Los análisis concluyeron que el número de días durante parte del



Temperaturas óptimas de crecimiento del hongo

El número de días en los que se alcanzan las temperaturas suaves preferidas por el hongo ha aumentado en los últimos años en Peñalara. Sin embargo, el aumento de las temperaturas no ha sido tan elevado como para alcanzarse las altas temperaturas que el hongo no puede soportar.

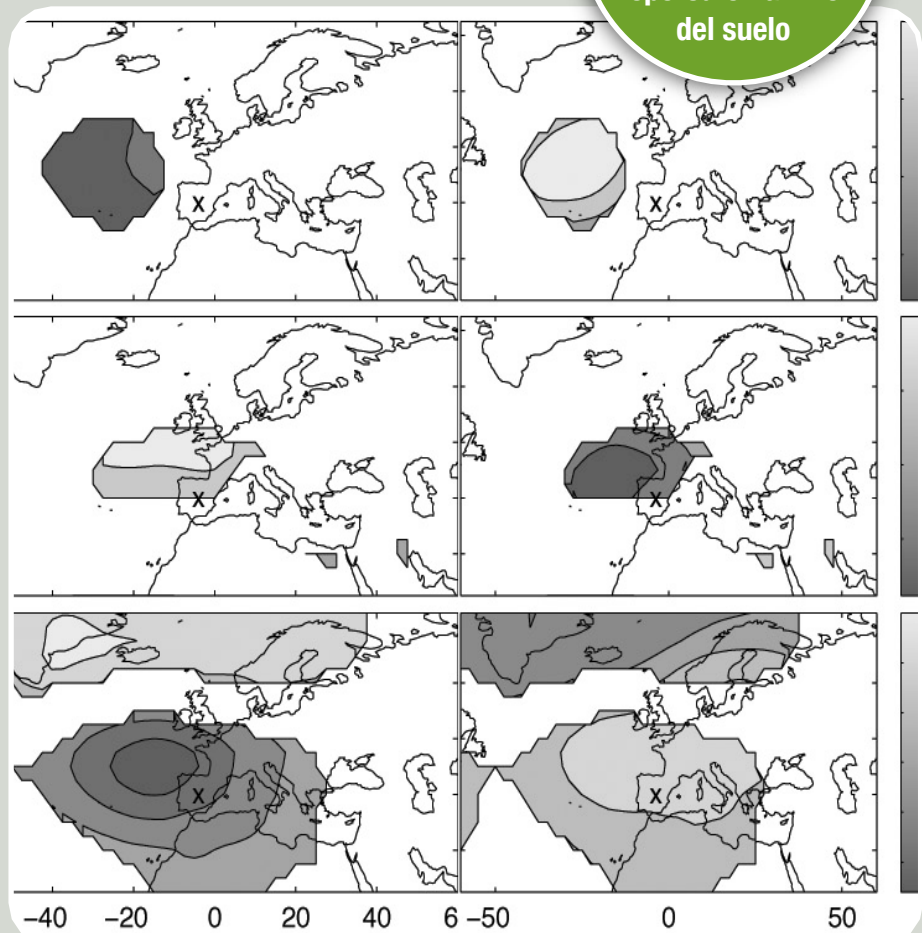
verano en los que se alcanzan temperaturas comprendidas entre 21 y 27°C, precisamente el rango de temperaturas óptimo para el crecimiento del hongo, se había incrementando drásticamente en la zona desde que se vienen sucediendo las mortalidades masivas. Al contrario, el número de días con temperaturas poco favorables para el desarrollo del hongo (inferiores a 21°C o superiores a 27°C) no ha variado significativamente en los últimos años.

Parece por tanto, que en los últimos años el calentamiento global en las zonas de montaña podría estar favoreciendo las temperaturas óptimas de crecimiento del hongo, mientras que por otro lado no ha hecho que se alcancen las temperaturas suficientemente altas que inhiben su crecimiento.

Desgraciadamente, parece que las zonas altas de montaña, demasiado frías antaño para el desarrollo del hongo, resultan ahora un ambiente ideal para el crecimiento del patógeno.

Estos estudios, realizados en el marco del proyecto, podrían explicar por qué las zonas de montaña son las zonas las afectadas por la quitridiomycosis en España y en gran parte de Europa, y confirman la necesidad de seguir profundizando en el análisis de las características medioambientales de las zonas afectadas y en la implicación del cambio climático en las enfermedades emergentes en anfibios.

Los cambios en las capas altas de la atmósfera también repercuten a nivel del suelo



OBJETIVO 5.



Análisis comparativos

La quitridiomycosis afecta de forma muy diferente a las distintas especies de anfibios, por lo que resulta muy complicado establecer comparaciones sobre la incidencia de la enfermedad entre zonas con especies de anfibios distintas.



Determinación de metodologías estandarizadas en la toma de muestras para el estudio de la quitridiomycosis.

Otro de los logros alcanzados en el proyecto ha sido la propuesta de métodos estandarizados para el estudio de la quitridiomycosis.

Quizás, nuestra propuesta mas interesante en este campo sea el uso de las larvas del sapo partero común (*A. obstetricans*) como organismo modelo para el estudio de la incidencia del hongo patógeno en Europa. Tras el análisis de mas de 3000 muestras de casi 25 especies de anfibios en España, hemos podido determinar que *A. obstetricans* es, sin duda, la especie mas susceptible al ataque del hongo. Además, este resultado coincide con la observación de que esta especie aparece implicada en todos y cada uno de los episodios de mortalidades masivas que hemos registrado en Europa durante el proyecto.

La propuesta para estandarizar un valor de prevalencia de la infección, dentro del amplio rango de distribución de *A. obstetricans* en Europa, que

Resulta esencial poder comparar la incidencia del hongo en distintos lugares

comprende desde Alemania hasta el sur de España, consiste en el análisis de 20 ejemplares de esta especie en fase larvaria. La muestra de cada ejemplar se toma mediante un frotis del disco oral con una torunda estéril que puede almacenarse a temperatura ambiente hasta

su análisis. Después, la cantidad de ADN del hongo patógeno recogida en cada muestra puede cuantificarse en el laboratorio mediante el uso de PCR en tiempo real. Otra de las ventajas de trabajar con las larvas de esta especie es la facilidad de obtener muestras, dado el elevado período larvario de la especie y su preferencia por masas de agua de carácter permanente.

Así por ejemplo en España hemos determinado que el hongo patógeno se encuentra presente en 27 de las 98 localidades donde hemos aplicado este protocolo. Curiosamente, no existe relación alguna entre las distintas variables ambientales analizadas en cada

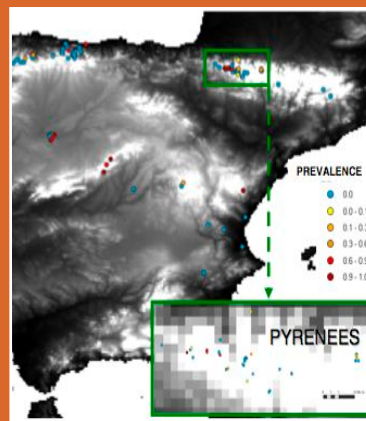
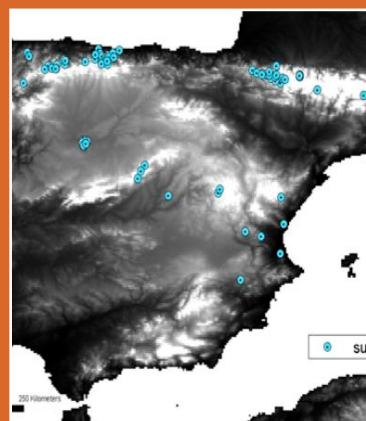
localidad y la prevalencia observada de la infección. Mas aún, la prevalencia observada es altamente variable entre localidades muy próximas, incluso entre los valores extremos de 0 y 100%. Sin embargo, los episodios de mortalidades masivas si que aparecen estadísticamente asociados a zonas altas (superiores a 1500 m de altura).

Estos resultados confirman, por un lado, que el hongo patógeno causante de la quitridiomicosis en anfibios presenta, desgraciadamente, unos requerimientos ambientales extraordinariamente bajos que hacen que pueda sobrevivir en prácticamente cualquier ambiente. Por otro lado, estos resultados indican que, no solo la presencia del hongo, sino incluso valores extremos

de prevalencia no van siempre asociados con mortalidades masivas y declives poblacionales, sino que por el contrario, frecuentemente son las condiciones ambientales las que juegan un papel determinante para desencadenar la enfermedad, probablemente como consecuencia de la mayor virulencia que alcanza el hongo dentro su rango óptimo de crecimiento.

Este protocolo propuesto esta siendo utilizado ya por investigadores franceses y suizos ajenos al proyecto, y servirá en un futuro próximo para llegar a conocer la situación real de la incidencia de la quitridiomicosis en Europa, donde actualmente solo ha sido estudiada en profundidad en nuestro país, y precisamente gracias al presente proyecto de investigación.

ORGANISMO MODELO

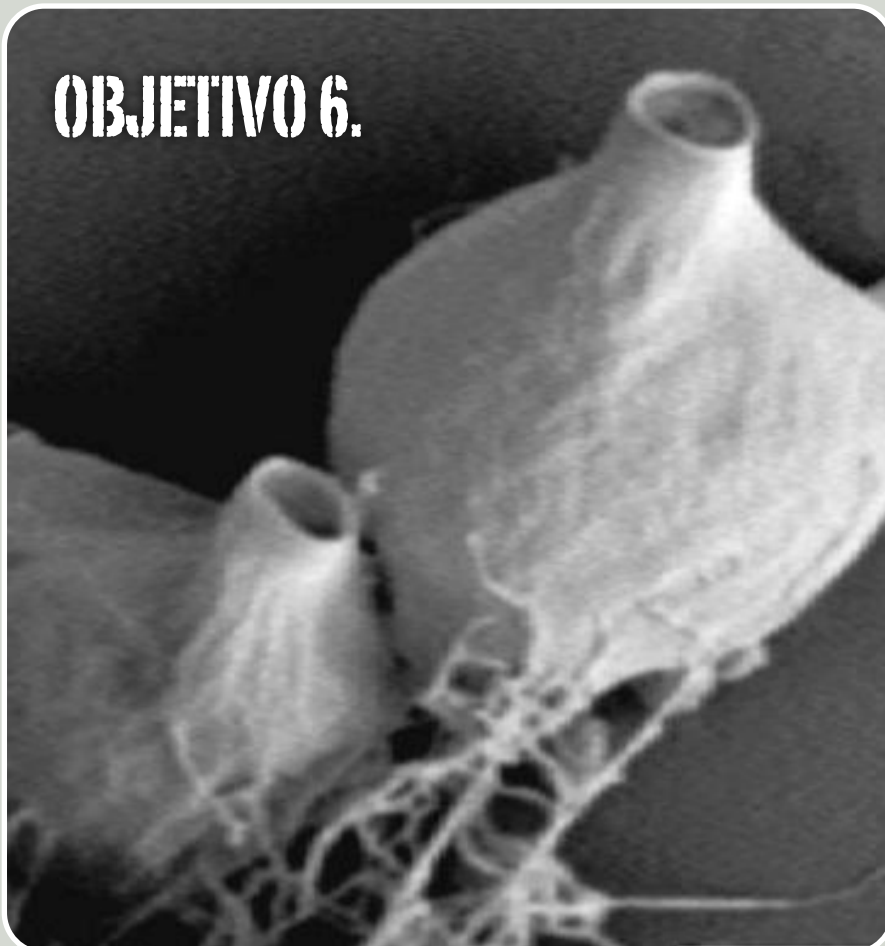


Larvas de sapo partero

Las larvas del sapo partero común se han revelado como un organismo modelo ideal para el análisis de la incidencia de la quitridiomicosis por varios motivos: alta susceptibilidad, facilidad de obtención de muestras, presencia en un amplio rango ecológico y geográfico, etc.

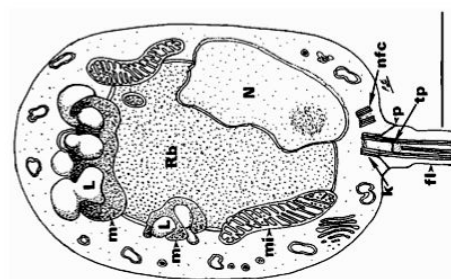
Zoosporas del hongo en la zona bucal de una larva de sapo partero

OBJETIVO 6.



Presencia en el medio

La determinación de la presencia del hongo patógeno en una determinada localidad requería, al inicio del proyecto, del análisis de ejemplares de anfibios. Sin embargo, para llegar a entender la dinámica de la enfermedad resulta imprescindible poder determinar la presencia del hongo en el medio.



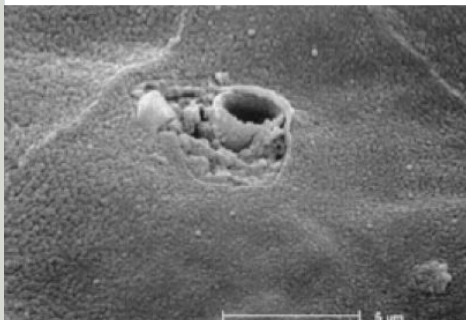
Determinación de técnicas de diagnóstico de la quitridiomycosis.

Antes del presente proyecto de investigación resultaba imprescindible el análisis de muestras de ejemplares de anfibios para la determinación de la presencia del hongo patógeno en el medio. Sin embargo, desde hace tiempo se sospechaba que el hongo patógeno podría ser capaz de sobrevivir como saprófito en el medio, incluso sin la presencia de anfibios hospedadores.

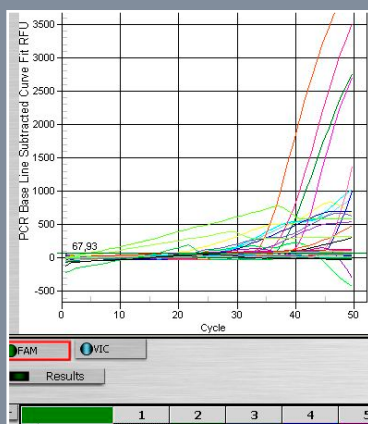
Por lo tanto, una de las metas del proyecto de investigación era la obtención de una metodología que nos permitiera, no solo la detección ambiental del

patógeno, sino la posibilidad de cuantificar la presencia del hongo en el medio sin la necesidad de obtener muestras de anfibios.

La metodología propuesta por nosotros para la determinación de la densidad del hongo patógeno ha sido publicada en la prestigiosa revista ***Diseases of Aquatic Organisms***, siendo la primera propuesta realizada a nivel mundial. El método propuesto consiste en el filtrado de pequeños volúmenes de agua utilizando una membrana de celulosa capaz de retener las zoosporas del hongo que se encuentran en el agua. Una

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	HISTOLOGÍA	MICROSCOPIA	RT PCR	FILTRADO AGUA
	El análisis de cortes histológicos de la piel de los anfibios puede revelar la presencia del hongo patógeno.	Los tubos de descarga del hongo en la piel de los anfibios pueden observarse mediante el microscopio electrónico.	La presencia del hongo en los anfibios puede determinarse mediante el análisis de tejidos con técnicas moleculares.	El nuevo método desarrollado detecta las zoosporas del hongo presentes en el medio.

FILTRADO AGUA



Proceso de análisis

La metodología propuesta se basa en el filtrado de pequeños volúmenes de agua mediante una jeringuilla y una membrana que recoge las zoosporas del hongo. Posteriormente, y ya en el laboratorio, se extrae el ADN del hongo y se cuantifica mediante técnicas moleculares de PCR en tiempo real.

vez que la membrana se ha saturado, esta se conserva congelada hasta su análisis en laboratorio. La extracción del ADN del hongo se realiza mediante un kit comercial usado para muestras de suelo, y la cuantificación del material genético del hongo se realiza mediante PCR cuantitativo.

Con esta metodología hemos logrado detectar la presencia del hongo patógeno en volúmenes de agua inferiores a 1 litro, y en mas del 60% de las masas de agua analizadas en la Sierra de Guadarrama en Madrid. Además, hemos determinado la presencia del hongo en masas de agua de otras zonas de montaña en España, fundamentalmente en la Cordillera Cantábrica y los Pirineos.

Esta metodología ha sido usada también en nuestros muestreos realizados en Costa Rica, cubriendo un amplio rango geográfico y en multitud de medios acuáticos distintos. Los resultados obtenidos

en este país son sorprendentes, ya que indican que la presencia del hongo patógeno en el medio es muy inferior a la observada en España, cuando por el contrario muchas especies de anfibios de Costa Rica están afectadas por la quitridiomycosis, y el hongo patógeno está presente en la gran mayoría de los ejemplares de anfibios analizados en las zonas estudiadas. Las diferencias encontradas en ambos países podrían explicarse por la mayor proporción de biomasa de anfibios presentes en las zonas tropicales, que haría que el hongo realizase todo su ciclo vital en los hospedadores. Por otro lado, este resultado podría estar relacionado con la escasa habilidad del hongo patógeno para sobrevivir en el medio compitiendo con otros microorganismos, lo que explicaría la idoneidad de las masas de agua oligotróficas de las zonas altas de montaña de España.

Vol. 77: 105–112, 2007
doi: 10.3354/dao01830

DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS
Dis Aquat Org

Published September 14

Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate

Susan F. Walker^{1,2,*}, Mario Baldi Salas^{2,5}, Daniel Jenkins¹, Trenton W. J. Garner², Andrew A. Cunningham², Alex D. Hyatt³, Jaime Bosch⁴, Matthew C. Fisher¹

¹Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College, St Mary's Campus, Norfolk Place, London W2 1PG, UK

²Institute of Zoology, Regents Park, London NW1 4RY, UK

³CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory, 5 Port Arlington Road, Geelong, Victoria 3220, Australia

⁴Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal, 2, 28006 Madrid, Spain

⁵Present address: Tropical Diseases Research Program, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Apartado Postal 304-3000, Heredia, Costa Rica

Primer
método para la
detección
ambiental del
hongo

ABSTRACT: The aetiological agent of amphibian chytridiomycosis is a primary cause of amphibian population declines. Current surveillance of *B. dendrobatidis* in its host but *in vitro* work suggests infective sporangia can persist in the environment for at least 3 mo. We describe here a surveillance system using a sensitive PCR that can detect *B. dendrobatidis* in small (<1 l) volumes of water. The sensitivity of the protocol for both water and sediment samples in environmental samples from the Sierra de Guadarrama mountain range in Spain, associated with chytrid-related die-offs and at other sites across Spain. *B. dendrobatidis* was detected in samples from 64% of the ponds in the Sierra de Guadarrama and at 2 sites outside this region, showing that levels of environmental *B. dendrobatidis* are high in temperate regions.

OBJETIVO 7.



Estudios multidisciplinarios

El estudio de la quitridiomycosis requiere el uso de multitud de técnicas de análisis, tales como la microscopía electrónica, la histología básica, o el análisis molecular mediante PCR en tiempo real, que necesitan un cierto grado de aprendizaje.



Aporte de conocimientos para la detección y el análisis de la enfermedad a los investigadores participantes de otros países.

Uno de los objetivos planteados en el proyecto de investigación es que este sirviese para aportar conocimientos a los investigadores participantes de otros países. Se perseguía así que el proyecto no solo sirviera para impulsar el conocimiento de la enfermedad en otras zonas del mundo, sino también para promover el desarrollo de grupos de investigación independientes en otros países.

Gracias al proyecto de investigación, todos los investigadores de otros países que han participado en el proyecto, y que no contaban al inicio de este con conocimientos en distintas técnicas de diagnóstico y de estudio de la enfermedad, han recibido instrucción. El proceso de instrucción se ha realizado, fundamentalmente, por parte del equipo británico y español del proyecto.

La instrucción de los investigadores se ha realizado tanto durante las visitas del responsable español del

proyecto a los diferentes centros de investigación de los otros países, como durante las visitas de los investigadores extranjeros a España e Inglaterra.

Entre la instrucción realizada por el responsable español en visitas a miembros del equipo de otros

países, destacan las realizadas en varias ocasiones a la Universidad de Chile, así como las realizadas al Poornaprajna Institute of Scientific Research en India.

Entre estas visitas de investigadores de otros países, cabe destacar la visita del Dr.

Merino del equipo ecuatoriano que realizó a España y a Inglaterra, y en las que recibió

instrucción sobre el uso de técnicas histológicas y moleculares para la detección del hongo patógeno.

También es de destacar el entrenamiento del responsable cubano del proyecto, Ariel Rodríguez, en técnicas moleculares que recibió durante su estancia en el Museo Nacional de Ciencias Naturales en Madrid.

**Todos los
participantes en el
proyecto han
intercambiado
conocimientos**