

Protocolo para el control de enfermedades infecciosas en Anfibios durante estudios de campo.

Gabriel A. Lobos, Marcela Vidal, M. Antonieta Labra, Claudio Correa, Felipe Rabanal, H. Díaz-Páez,
Alejandra Alzamora y Claudio Soto

Introducción

La declinación de anfibios a nivel global, constituye un proceso complejo de dimensionar y evaluar, en especial en países como Chile, donde se presenta un escenario con escasa información de inventarios y conocimiento de las poblaciones a nivel local. En este sentido, la Red Chilena de Herpetología RECH, se ha propuesto como misión elaborar un primer protocolo para el control de la diseminación de patógenos que han sido asociados a la pérdida de anfibios a nivel global. El objetivo del manual, es proteger a los anfibios de enfermedades que puedan ser transmitidas involuntariamente por los seres humanos.

Chile presenta una batracofauna compuesta solo por anuros (ranas y sapos), estando ausente los demás ordenes vivientes. De acuerdo a Frost et al. (2006) y Frost (2011), se reconocen para Chile las familias Bufonidae (*Rhinella*, *Nannophryne*), Calyptocephalellidae (*Telmatobufo*, *Calyptocephalella*), Ceratophryidae (*Telmatobius*, *Atelognathus*, *Batrachyla*), Leiuperidae (*Pleurodema*) y Cycloramphidae (*Hylorina*, *Alsodes*, *Eupsophus*, *Rhinoderma*, *Insuetophrynus*). Además se debe considerar la presencia de la rana africana de garras de la familia Pipidae (*Xenopus laevis*). Respecto al número de especies descritas en Chile, las últimas revisiones señalan 56 especies (Ortiz y Díaz-Páez 2006, Veloso 2006), 57 especies (IUCN 2011) y 59 especies (Vidal et al 2008).

En términos de biodiversidad, dos aspectos son relevantes para la batracofauna nacional. Por una parte, destaca su alto grado de endemismo, con aproximadamente un 58% de las especies en esta categoría y con la presencia de numerosos microendemismos (*Alsodes tumultuosus* de La Parva, *Eupsophus migueli* de Mehuín, *Telmatobius dankoi* de Las Cascadas, cerca de Calama, solo por mencionar algunos ejemplos de especies que no se encuentran en áreas protegidas) (Díaz-Páez et al 2008, Ortiz y Heatwole 2010). Un segundo aspecto interesante corresponde a la presencia de géneros monotípicos (*Calyptocephalella*, *Hylorina*, *Insuetophrynus*), lo que es propio de linajes antiguos con baja diversificación.

En la actualidad, existe una creciente preocupación a nivel global por la declinación o desaparición de numerosas poblaciones de anfibios (Alford & Richards 1999, Stuart et al. 2008, Collins 2010, Blaustein et al. 2011). Diversas hipótesis han sido señaladas en este sentido, como el cambio climático (Pounds 2001, Carey & Alexander 2003), la pérdida de hábitat (Petranka et al. 1993), aumento de la radiación ultravioleta (Anzalone et al. 1998, Lizana & Pedraza 1998), enfermedades (Johnson et al. 1999, Kiesecker et al. 2001, Mazzoni et al. 2003, Weldon et al.

2004), contaminación (Lips 1998, Davidson et al. 2001) e introducción de especies (Gamradt y Kats 1996, Hecnar & M'Closkey 1997, Lawler et al. 1999, Kats y Ferrer 2003). Por estas razones, hoy los anfibios juegan un rol importante como especies centinelas de procesos globales que sin duda también pueden afectar a los seres humanos.

En este contexto, enfermedades emergentes como las producidas por el hongo chytrido, *Batrachochytrium dendrobatidis*, y virus del género *Ranavirus*, han sido asociados con fenómenos de declinación de poblaciones de anfibios en distintas partes del mundo. Por otro lado, se ha podido comprobar que diversos trematodos (más de 40 especies de más de 30 géneros y dos familias) parasitan a los anfibios y utilizan sus larvas como hospedadores intermediarios, generando malformaciones importantes en ellos (Speare 2001). Además, algunos géneros de nemátodos como *Rhabdias*, normalmente presentes en los pulmones de diversos anfibios, pueden resultar letales cuando estos alcanzan una alta densidad en sus hospedadores (Bosch 2003). En Chile, Bourke *et al.* (2010) y Solís *et al.* (2010) constituyen los primeros reportes de la presencia de *B. dendrobatidis* en poblaciones naturales, por lo que, se hace perentoria la necesidad de reducir la diseminación de patógenos producto de la manipulación de estos organismos. De hecho, la manipulación de anfibios puede facilitar la diseminación de patógenos hacia nuevos ambientes, como puede ocurrir durante procedimientos de rescates y relocalizaciones, captura de individuos para investigación, manipulación de anuros en laboratorios (*Xenopus laevis*) o comercio de anfibios (por ejemplo el caso de *Calyptocephalella gayi*). Esto implica que se requiere con urgencia establecer un manual básico para la manipulación de anfibios en el campo, el que se entrega a continuación. Este protocolo sigue los criterios sugeridos por Speare (2001). Es importante considerar que la captura y manipulación de anfibios, se encuentra regulada en el país, por lo que para este tipo de actividad se requiere de un permiso que es otorgado por el Servicio Agrícola y Ganadero de Chile.

Por otra parte, hacemos ver que en el actual contexto de enfermedades emergentes, la translocación de anfibios (e.g., rescates y relocalización, capturas científicas, comercio e intercambio de anfibios), representa un serio peligro, sobre todo para especies de anfibios vulnerables, debido a la potencial diseminación de patógenos. Por esta razón, los procedimientos de captura, manipulación y desinfección de materiales deberían ajustarse a un protocolo estricto, que propenda a disminuir este riesgo. Finalmente, cabe señalar que el presente protocolo está pensado para proyectos de investigación, comercio de anfibios, desarrollo de Líneas Bases y otros estudios que requieren de un contacto más estrecho con anuros o sus sitios de reproducción. En el caso de los naturalistas, las medidas preventivas que puedan desprenderse del presente protocolo son necesarias para disminuir el riesgo de transmisión de patógenos. Del mismo modo, medidas simples como portar guantes y bolsas desechables para la potencial manipulación de anfibios, son altamente recomendables.

Protocolo

Dos aspectos son fundamentales, en primer lugar, la planificación de estos protocolos antes de ir al campo, y en segundo lugar, la concientización que debemos tener acerca de nuestra responsabilidad en la manipulación de anfibios. Frente al desconocimiento del estado sanitario de la mayoría de las poblaciones de anfibios del país, es que resulta aconsejable la adopción de principios precautorios, a la espera de mayor evidencia científica sobre la presencia de enfermedades y sus impactos en poblaciones de anuros silvestres.

1- Disminución del riesgo entre sitios

Es importante poder disminuir el riesgo de transmisión de patógenos entre sitios. Debido a las dificultades prácticas de diferenciar los sitios, es que se recomienda como principio precautorio considerar a cada cuerpo de agua (e.g., lago, laguna, charca) como un sitio independiente, debiendo evitarse la transferencia de material entre los sitios. En el caso de cursos de aguas (e.g., ríos, arroyos, esteros), normalmente se trabaja con estaciones de muestreos (el número dependerá de la magnitud del estudio), por lo que también siguiendo un criterio precautorio, se recomienda considerar a cada estación de muestreo como un sitio independiente. En el caso de ambientes terrestres (e.g. bosques, praderas, vegas), donde se observa una mayor homogeneidad ambiental, se sugiere considerar sesiones de trabajo de acuerdo a esfuerzos de muestreos (un día, mediodía; de acuerdo a la magnitud del trabajo).

Calzado y vestimenta

- Para las personas que realizan investigación en anfibios, es altamente recomendable trabajar con botas de goma o trajes de agua, debido a la facilidad de su limpieza y desinfección. El calzado debe ser limpiado y desinfectado (ver más adelante) **antes** de ir a un terreno, con lo que se disminuye de forma importante el riesgo de diseminación de patógenos. Una vez en terreno, el calzado debe ser desinfectado, antes de visitar un nuevo sitio o comenzar una nueva sesión de trabajo.
- Se debe remover todo el barro y restos vegetales del calzado, ya sea con abundante agua del lugar visitado o con agua potable previamente embotellada. Este paso resulta fundamental, ya que la materia orgánica interactúa con los desinfectantes, inactivándolos o reduciendo su eficacia. Por otro lado, la presencia de barro permite la existencia de microambientes donde el patógeno puede sobrevivir debido a que el desinfectante no puede penetrar. Posteriormente el calzado debe ser sumergido en una solución desinfectante de virkon 1% (10 g/l, DuPont Animal Health Solutions) por un minuto. Como alternativa se puede repetir el mismo procedimiento con una solución de cloro (hipoclorito de sodio) al 4%, sin embargo su acción es significativamente menor al virkon (e.g. cloro destruye Ranavirus después de 15 min). Otra ventaja del virkon, es que es un producto biodegradable (no así el cloro), situación que facilita su manejo y disposición en

terreno. Otros desinfectantes y con su eficacia aparecen en Tabla 1. En el caso de trabajos con especies seriamente amenazadas, se recomienda cambio de calzado entre sitios.

- Si bien no se hace necesaria la desinfección de toda la vestimenta usada, si es recomendable desinfectar la parte baja de pantalones (o polainas), cuando no se utilizan botas de goma o trajes de agua. Para esto se debe seguir el mismo método usado para el calzado.
- En el caso de estudios más invasivos (toma de muestras de órganos, necropsias) puede ser adecuado el uso de trajes de papel desechables (trajes para pintar), los que deben ser eliminados una vez terminada la jornada de trabajo en un sitio, o bien en caso de trasladarse a otro sitio.

Tabla 1. Estrategias adecuadas para la eliminación de *Batrachochytrium dendrobatidis* y Ranavirus en estudios de campo. Las concentraciones y tiempos de acción, son los valores mínimos efectivos. Obtenidos de Speare *et al.* (2004).

Propósito	Desinfectante	Concentración	Tiempo	Patógeno que combate
Desinfectar equipamiento quirúrgico y otros instrumentos (e.g., balanza)	Etanol	70%	1 min	<i>B. dendrobatidis</i> <i>Ranavirus</i>
	Vircon	1 mg/ml	1 min	<i>B. dendrobatidis</i> <i>Ranavirus</i>
	Cloruro de Benzalconio	1 mg/ml	1 min	<i>B. dendrobatidis</i>
Desinfectar equipamiento de transporte y contenedores	Hipoclorito de Sodio (blanqueador)	1%	1 min	<i>B. dendrobatidis</i>
	Hipoclorito de Sodio (blanqueador)	4%	15 min	<i>Ranavirus</i>
	Cloruro de didecil-dimetil amonio	1 en 1000 ml	30 seg	<i>B. dendrobatidis</i>
	Secado completo		3 horas o mas	<i>B. dendrobatidis</i>
	Calor	60 °C	5 min 15 min	<i>B. dendrobatidis</i> <i>Ranavirus</i>
	Esterilización con luz UV		1 min	<i>B. dendrobatidis</i>
Desinfectar calzado	Hipoclorito de Sodio (Blanqueador)	1%	1 min	<i>B. dendrobatidis</i>
	Hipoclorito de Sodio (Blanqueador)	4%	15 min	<i>Ranavirus</i>
	Cloruro de didecil-dimetil amonio	1 en 1000 ml	1 min	<i>B. dendrobatidis</i>
	Secado completo		3 horas o mas	<i>B. dendrobatidis</i>
Desinfectar ropa (e.g., bolsas, ropa)	Lavado caliente	60 °C o mas	5 min 15 min	<i>B. dendrobatidis</i> <i>Ranavirus</i>

Materiales desechables:

- Resulta necesario el uso de guantes de nitrilo (guates azules) desechables, para evitar dañar la delicada piel de los anfibios.
- Cuando se requiera muestrear, medir o pesar individuos, se recomienda el uso de bolsas plásticas herméticas (e.g. ziploc) en las que se pueden mantener de forma cada individuo. Las bolsas puede ser nuevas, o si reutilizadas, deben estar previamente desinfectadas, enjuagadas con agua y secas. Larvas o guarisapos del mismo sitio (poza, charco), pueden ser manejados en un recipiente plástico, previamente desinfectado, enjuagado y seco.
- Una vez manipulados los individuos, tanto adultos como larvas deben ser liberados en el lugar exacto de la captura. Para este motivo, se pueden marcar durante la captura los sitios con perros plásticos (y cintas reflectantes en el caso de capturas nocturnas).
- Una vez finalizada la manipulación de los individuos, todo el material utilizado (guantes, bolsas plásticas, recipientes, perros, cintas, etc.), deben ser dispuestos en una bolsa plástica limpia (bolsa de basura), para su posterior desinfección o destrucción en incineradores.
- Al finalizar el trabajo, se deben desinfectar todo el material desechable utilizado (guantes, bolsas plásticas), sumergiendo este en una solución de virkon al 1%. utilizados, con una botella aspersora (con una solución de alcohol al 70% o cloro al 0,4%). Los manipuladores de anfibios pueden rociarse el traje de papel antes de sacárselo (con los guantes puestos) y finalmente eliminar los guantes y el traje.

Equipos y otros materiales

Los equipos y materiales de trabajo (e.g., redes, chinguillos, pesolas, balanzas), deben ser desinfectados antes de llevarlos al campo. Para material pequeño como balanzas, pie de metro y otros, se recomienda el uso de etanol al 70% o cualquier desinfectante de la tabla 1. En el caso de redes, debido a su mayor tamaño, se recomienda rociar una solución desinfectante como virkon 1%, con el uso de un aspersor adecuado.

Vehículos

Las ruedas y neumáticos de los vehículos podrían facilitar la diseminación de patógenos. Por ello, es necesario que al finalizar el trabajo en un sitio, ellos sean lavados y desinfectados con alguno de los desinfectantes que aparecen en la Tabla 1 (por ejemplo, virkon 1%). Se debe tener cuidado con aplicar estas sustancias a una distancia prudente para no contaminar cuerpos o cursos de aguas. Del mismo modo, la desinfección del calzado es importante para no contaminar indirectamente los neumáticos de los vehículos (es común sacudirse el barro del calzado en los neumáticos y otras estructuras de los vehículos).

Manipulación de animales

Los animales solo deben ser manipulados en casos justificados. Muchas veces, como suele suceder en estudios de impacto ambiental, solo se requiere el reconocimiento y conteo de animales, sin

ser necesaria su manipulación. Sin embargo, en caso de ser necesaria la manipulación, siempre es importante considerar el riesgo de transmisión de patógenos a los animales. Para ello se recomienda:

- Desinfectar las manos antes de la manipulación. Usar guantes de látex para el manejo de animales (sin talco). Una forma práctica y segura es usar doble guante. Los guantes deben ser dispuestos en una bolsa plástica limpia para su eliminación (bolsa sucia). La finalización del trabajo debe ser el cierre de la bolsa sucia (manipulada con guantes), a la que se comprime y saca el aire, se arrojan los guantes de los manipuladores y la última persona en sacarse sus guantes (revirtiéndolos) sella la bolsa con cinta adhesiva plástica. Al finalizar, todos se deben desinfectar las manos (por ejemplo, con alcohol gel de uso comercial). El procedimiento se debe ejecutar en cada sitio.
- En el caso de disponer a los anfibios en bolsas de recolecta, ellas deben ser de usos individuales y eliminadas luego de su utilización. El marcaje de animales con dispositivos subcutáneos como microchips, corte de dedos y toma de muestra de tejidos, es de alto riesgo para la transmisión de enfermedades (Speare 2001). De ser necesario, se debe promover el uso de elementos desechables, desinfección de equipos. En el caso de heridas se debería contar con sustancias sellantes de uso veterinario, las que disminuyen el riesgo de infección.
- Es importante recalcar que las sustancias desinfectantes no deben estar en contacto con los cursos o cuerpos de aguas, ni tampoco con la piel de los animales.

2- Disminución del riesgo dentro del sitio

Al igual que como se señaló para el manejo entre sitios, es necesario considerar medidas tendientes a disminuir el riesgo de transmisión dentro del sitio, a objeto de que los investigadores no eleven el nivel natural de infección que pueda existir en una población. Muchas de las medidas señaladas entre sitios, deberían ser consideradas para este punto. Adicionalmente se debería considerar:

- Uso de guantes sin talco (nitrilo) y bolsas plásticas individuales por cada anfibio.
- Todo el equipo debe ser desinfectado en terreno.
- De ser necesaria la captura y transporte de anfibios, ello se debe realizar en contenedores individuales.
- Los contenedores pueden ser reutilizados previa desinfección con, virkon, alcohol, cloro, u otro desinfectante adecuado.
- Implementos como reglas y pesolas deben estar libres de secreciones y se deben esterilizar con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 0.4%, las superficies de los implementos deben estar en contacto al menos 30 segundos con las sustancias desinfectantes.
- En caso de pesar los anfibios en bolsas, ellas deben ser individuales y desechadas. Este procedimiento evita el contacto de los animales con los instrumentos. Eventualmente la

toma de medidas morfométricas simples como el largo hocico cloaca pueden ser obtenidos con el animal en la bolsa.

- En el caso de detectar anfibios enfermos, ellos pueden ser colectados con guantes o una bolsa plástica y puestos en un recipiente para su traslado a un laboratorio ya sea para su diagnóstico o eliminación. Estos animales no pueden ser reintroducidos.

3- Referencias bibliográficas

- ALFORD RA & RICHARDS SJ (1999) Global amphibians declines: A problem in applied ecology. *Annual Review Ecology Systematic* 30: 133-165.
- ANZALONE CR, KATS LB & GORDONS MS (1998) Effects of solar UV – B radiation on embryonic development in *Hyla cadaverina*, *Hyla regilla*, and *Taricha torosa*. *Conservation Biology* 12 (3): 646-653.
- BLAUSTEIN, A.R., HAN, B.A., RELYEA, R.A., JOHNSON, P.T., BUCK, J.C., GERVASI, S.S. & KATS, L.B (2011) The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223(1):108-119.
- BOSCH J (2003) Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *MUNIBE (suplemento/gehigarria)* 16: 56-71.
- BOURKE, J., MUTSCHMANN, F., OHST, T., ULMER, P., GUTSCHE, A., BUSSE, K., WERNING, H., & BOEHME, W (2010) *Batrachochytrium dendrobatidis* in Darwin's frog *Rhinoderma* spp. in Chile. *92(2-3):217-221*.
- CAREY C & MA ALEXANDER (2003) Climate change and amphibian declines: is the realink?. *Diversity and Distribution* 9: 111-121.
- COLLINS, JP (2010) Amphibian decline and extinction: What we know and what we need to learn. *Diseases of Aquatic Organisms* 92(2-3):93-99.
- DAVIDSON C, SHAFFER HB & JENNINGS MR (2001) Spatial test of the pesticide drift, habitat destruction, UV – B, and climate change hypotheses for California Amphibians declines. *Conservation Biology* 16 (6): 1588-1601.
- DIAZ-PAEZ H & ORTIZ JC (2003) Evaluación del estado de conservación de los anfibios de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 509-525.
- DIAZ-PAEZ H, NÚÑEZ JJ, NÚÑEZ H & ORTIZ (2008) Estado de conservación de anfibios y reptiles. pp 233-267. En Vidal M & Labra A. *Herpetología de Chile*. Science Verlag Ediciones, 593 pp.
- FROST DR, GRANT T, FAIVOVICH J, BAIN RH, HASS A, HADDAD CFB, DE SA R, CHANNING A, WILKINSON M, DONNELLAN SC, RAXWORTHY CJ, CAMPBELL JA, BLOTTO BL, MOLER P, DREWES RC, NAUSSBAUM RA, LYNCH JD, GREEN DM & WHEELER WC (2006) The amphibian tree of life. *Bulletin American Museum of Natural History* 297. 370 p.
- FROST DR (2011) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (31 January, 2011). Electronic database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- GAMRADT SC & KATS LB (1996) Effect of introduced Crayfish and Mosquitofish on California Newts. *Conservation Biology* 10 (4): 1155-1162.
- HECNAR SJ & M'CLOSKEY RT (1997) The effects of predatory fish on amphibian species richness and distribution. *Biological Conservation* 79: 123-131.
- JOHNSON PTJ, LUNDE KB, RITCHIE EG & LAUNER AE (1999) The effect of trematode infection

- on amphibian limb development and survivorship. *Science* (284): 802-804.
- KATS LB & FERRER RP (2003) Alien predators and amphibian declines: review of two decades of science and the transition to conservation. *Diversity and Distribution* 9: 99-110.
- KIESECKER JM, BLAUSTEIN AR & BELDEN L (2001) Complex causes of amphibian population declines. *Nature* 410: 681-683.
- LAWLER SP, DRITZ D, STRANGE T & HOLYOAK M (1999) Effects of introduced mosquitofish and bullfrog on the threatened California redlegged frog. *Conservation Biology* 13: 613-622.
- LIPS KR (1998) Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology* 12 (1): 106-117.
- LIZANA M & PEDRAZA EM (1998) The effects of UV – B radiation on toad mortality in mountainous Areas of central Spain. *Conservation Biology* 12 (3): 703-707.
- MAZZONI R, CUNNINGHAM AA, DASZAK P, APOLO A, PERDOMO E & SPERENZA G (2003) Emerging pathogen of wild amphibians in frog (*Rana castesbeiana*) farmer for international trade. *Emerging Infectious Diseases* 9 (8): 995-998.
- ORTIZ JC & H DÍAZ-PÁEZ (2006) Estado del conocimiento de los anfibios de Chile. *Gayana (Chile)* 70: 114-121.
- ORTIZ JC & HEATWOLE H (2010) Status of Conservation and Decline of the Amphibians of Chile: 20-29. In: Heatwoli, H y Barrio-Amorós, C (eds.) *Amphibian Biology. Status of Decline of Amphibians; Western Hemisphere*. 9 (1) 78 pp.
- PETRANKA JW, ELDRIDGE ME & HALEY KE (1993) Effects of timber harvesting on southern Appalachian salamanders. *Conservation Biological* 7: 363-370.
- POUNDS JA (2001) Climate and amphibian declines. *Nature* 410: 639-640.
- SOLÍS, R., LOBOS, G., WALKER, S.F., FISHER, M. & BOSCH, J (2010) Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in feral populations of *Xenopus laevis* in Chile. *Biological Invasions* 12(6):1641-1646.
- SPEARE R (2001) Developing management strategies to control amphibian diseases: Decreasing the risks due to communicable diseases. School of Public Health and Tropical Medicine, James Cook University: Townsville. 2001.
- STUART, S., HOFFMANN, M., CHANSON, J., COX, N., BERRIDGE, R., RAMANI, P. & YOUNG, B (Eds.) (2008) *Threatened Amphibians of the World*. Lynx Edicions, with IUCN - The World Conservation Union, Conservation International and NatureServe, Barcelona. 776 pp.
- VIDAL M, ITURRA-CID M & ORTIZ JC (2008) Clasificación de anfibios y reptiles. pp 79-106. En Vidal M & Labra A. *Herpetología de Chile*. Science Verlag Ediciones, 593 pp.
- VELOSO A (2006) Batracios de las cuencas hidrográficas de Chile: origen, diversidad y estado de conservación. En: Vila I, A Veloso, R Schlatter & C Ramírez (eds) *Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile*: 103-140. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 190 pp.
- WELDON C, DU PREEZ LH, HYATT AD, MULLER R & SPEARE R (2004) Origin of the amphibian Chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 10(12): 2100-2105.