



# **UNIVERSIDAD DE CUENCA**

## **FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

### **CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

“Implementación y evaluación de un ensayo de PCR para la detección del agente causal de la quitridiomycosis”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista.

**Autora:**

Noemí Gabriela Torres Sarango

**CI:** 0105334304

**Director:**

Antonio Javier Vallecillo Maza, PhD.

**CI:** 0151059417

**Cuenca – Ecuador**

**09/09/2019**



## RESUMEN

La quitridiomycosis es una enfermedad emergente que ha causado la disminución a nivel mundial de al menos 500 especies de anfibios. Desde la descripción de su agente causal, *Batrachochytrium dendrobatidis*, se han desarrollado varias técnicas de diagnóstico, entre ellas la más utilizada la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En Ecuador, son pocas las instituciones que realizan el diagnóstico confiable de este patógeno. En el presente trabajo se desarrolló una prueba de PCR convencional múltiple, que detecta material genético del hongo y de anfibios. Se hicieron varios ensayos para comprobar el rendimiento de los cebadores universales de anfibios y del hongo a partir de muestras de ranas y establecer así un protocolo para el diagnóstico. El par de oligonucleótidos ANFFor/ANFRev fue usado para la amplificación de ADN de anfibios y Bd1a/Bd2a para el hongo. La amplificación de material genético de anfibios funcionó como un control de proceso, permitiéndonos saber si la muestra fue tomada adecuadamente y si la extracción de ADN, previo a la amplificación, fue la apropiada. El ensayo para el diagnóstico se realizó en 85 muestras de ranas de cinco localidades del Azuay. Se evaluó la sensibilidad y especificidad diagnósticas del ensayo, comparando los resultados con los obtenidos bajo la prueba de PCR en tiempo real, en la que se utilizó los cebadores ITS1-3Bd/5.8SBd. Se obtuvo un 14,29 % de sensibilidad y un 95% de especificidad. La prevalencia de la enfermedad fue obtenida según los resultados de la PCR en tiempo real y fue del 25,93 %.

**Palabras clave:** Anfibios. Quitridiomycosis. Diagnóstico. Sensibilidad. Especificidad.



## ABSTRACT

Chytridiomycosis is an emerging disease that has caused worldwide decline of at least 500 species of amphibians. Since the description of the causative agent of this mycosis, *Batrachochytrium dendrobatidis*, several diagnostic techniques have been developed, among them the most used is the polymerase chain reaction (PCR) test. In Ecuador, there are few institutions in which reliable diagnosis of this pathogen can be made. In the present work a multiple conventional PCR test was developed, which detects genetic material of the fungus and amphibians. Several tests were conducted to verify the performance of the universal amphibian primers and the fungus from frog samples and thus establish a protocol for diagnosis. The ANFFor/ANFRev oligonucleotide pair was used for amplification of amphibian DNA and Bd1a/Bd2a for the fungus. The amplification of amphibian genetic material functioned as a process control, allowing us to know if the sample was taken properly and if the DNA extraction, prior to amplification, was appropriate. The diagnostic test was conducted in 85 frog samples from five locations in Azuay. The diagnostic sensitivity and specificity of the assay was evaluated, comparing the results with those obtained under the real-time PCR test, in which ITS1-3Bd/5.8SBd primers were used. A 14.29% sensitivity and 95% specificity were obtained. The prevalence of the disease was obtained according to the results of the real-time PCR and was 25.93%.

**Key words:** Amphibians. Chytridiomycosis. Diagnosis. Sensitivity. Specificity.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN .....	2
ABSTRACT.....	3
INDICE DE TABLAS.....	8
INDICE DE FIGURAS .....	10
INDICE DE ANEXOS .....	11
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA.....	12
DEDICATORIA .....	15
AGRADECIMIENTOS .....	16
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....	17
1.1 Objetivo general: .....	18
1.2 Objetivos específicos.....	18
1.3 Pregunta de investigación:.....	18
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 LOS ANFIBIOS.....	19
2.1.1 Amenazas de los anfibios.....	19
2.1.2 Las poblaciones de anfibios en el Ecuador.....	20
2.2 ENFERMEDADES INFECCIOSAS EMERGENTES: QUITRIDOMICOSIS.....	21
2.2.1 Historia de la enfermedad e identificación del agente causal. ....	21
2.2.2 Impacto de la quitridiomycosis.....	22
2.2.3 Distribución mundial de la enfermedad.....	22
2.2.4 Quitridiomycosis en Ecuador.....	23
2.2.5 Descripción general del agente causal. ....	23
2.2.6 Ciclo de vida de <i>B. dendrobatidis</i> . ....	24
2.2.7 Signología. ....	24
2.2.8 Control y tratamiento de la enfermedad.....	25
2.2.9 Diagnóstico del hongo quítrido. ....	26
2.3 VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS BASADAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR. ....	28



2.3.1	Sensibilidad analítica.....	29
2.3.2	Especificidad analítica.....	29
2.3.3	Uso de controles de proceso.....	29
2.3.4	Control basado en material genético del hospedador.....	30
<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>		<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Ubicación del estudio y unidad de análisis.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2</b>	<b>Solicitud del permiso de investigación.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3</b>	<b>Obtención de un control de proceso válido.....</b>	<b>31</b>
3.3.1	Procedimiento para la colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras de tejidos de animales susceptibles o con signología clínica compatible con quitridiomycosis. .	31
3.3.2	Procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico total de anfibios.....	32
3.3.3	Preparación de las reacciones de amplificación de material genético de anfibios .....	34
3.3.4	Procedimiento para la amplificación de material genético de anfibios .....	35
3.3.5	Detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio y fotodocumentación de los resultados. ....	36
<b>3.4</b>	<b>Detección de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> en muestras de dos especies de ranas.....</b>	<b>38</b>
3.4.1	Preparación de reacciones para la amplificación de material genético de <i>Bd</i> en muestras de tejido de dos ranas.....	38
3.4.2	Procedimiento para la amplificación de material genético de <i>Bd</i> a partir de tejidos de ranas.	39
3.4.3	Detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio y fotodocumentación de los resultados. ....	40
<b>3.5</b>	<b>Optimización de la temperatura media de hibridación para la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i>.....</b>	<b>42</b>
3.5.1	Preparación de reacciones para la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> en muestras de tejido de ranas. ....	42
3.5.2	Procedimiento para la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> a diferentes temperaturas a partir de tejidos de ranas. ....	43
3.5.3	Detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio y fotodocumentación de los resultados. ....	44
<b>3.6</b>	<b>Optimización de la temperatura media de hibridación del ensayo de PCR múltiple para la amplificación del control de proceso y de material genético de <i>B. dendrobatidis</i>.....</b>	<b>46</b>
3.6.1	Preparación de las reacciones de amplificación de material genético de anfibios y de <i>B. dendrobatidis</i> . ....	46
3.6.2	Procedimiento para la amplificación de material genético de anfibios .....	48
3.6.3	Procedimiento para la detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio y fotodocumentación de los resultados. .	49



<b>3.7 PCR múltiple para la detección de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> de las muestras de hisopados de ranas susceptibles o con signología compatible a quitridiomycosis.....</b>	<b>50</b>
3.7.1 Colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras de hisopados de anfibios susceptibles o con signología clínica compatible con quitridiomycosis. ....	50
3.7.2 Procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) del control y de <i>B. dendrobatidis</i> . ....	52
3.7.3 Preparación de las reacciones de amplificación de ADN de control y de ADN de <i>B. dendrobatidis</i> . ....	54
3.7.4 Procedimiento para la amplificación de ADN de control y material genético de <i>B. dendrobatidis</i> . ....	55
3.7.5 Procedimiento para la detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio y fotodocumentación de los resultados. .	56
<b>3.8 Repetición del ensayo de PCR múltiple en muestras que no amplificaron el control de proceso. ....</b>	<b>58</b>
<b>3.9 Optimización del ensayo de PCR en tiempo real para la detección de material genético de <i>B. dendrobatidis</i>. ....</b>	<b>58</b>
3.9.1 Preparación de reacciones para la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> mediante qPCR.....	58
3.9.2 Procedimiento para la amplificación de material genético <i>B. dendrobatidis</i> mediante qPCR 60	
<b>3.10 PCR en tiempo real para la detección de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> de las muestras de hisopados de ranas susceptibles o con signología compatible a quitridiomycosis.....</b>	<b>61</b>
3.10.1 Preparación de reacciones para la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> a partir de hisopados de piel de ranas mediante qPCR. ....	61
3.10.2 Procedimiento para la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> a partir de hisopados de piel de ranas mediante qPCR. ....	62
<b>3.11 Análisis estadístico. ....</b>	<b>63</b>
<b>CAPITULO IV: RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1 Obtención del control de proceso válido. ....</b>	<b>64</b>
<b>4.2 Detección de material genético de <i>B. dendrobatidis</i>. ....</b>	<b>65</b>
<b>4.3 Optimización de la temperatura de hibridación para la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i>. ....</b>	<b>65</b>
<b>4.4 Optimización de la temperatura media de hibridación del ensayo de PCR múltiple para la amplificación del control de proceso y detección de material genético de <i>Bd.</i> ....</b>	<b>66</b>



4.5 PCR múltiple para la detección de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> en muestras de hisopados de ranas susceptibles o con signología compatible a quitridiomycosis.....	67
4.6 Repetición del ensayo de PCR múltiple en muestras que no amplificaron el control de proceso. ....	69
4.7 Resultados de la optimización del ensayo de PCR en tiempo real para la detección de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> . ....	69
4.8 Resultados del análisis de las muestras de hisopado con PCR en tiempo real. ....	69
4.9 Cálculo de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo de PCR convencional múltiple. ....	70
4.10 Cálculo de la prevalencia de la enfermedad .....	70
CAPITULO V: DISCUSIÓN.....	71
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES .....	73
CAPITULO VII: RECOMENDACIONES .....	74
CAPITULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	75
CAPITULO IX. ANEXOS.....	81



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Reactivos de la premezcla A y B para amplificación de material genético de anfibios de las especies <i>A. exiguus</i> y <i>G. aff. pseustes</i> .....	35
<b>Tabla 2:</b> Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético de anfibios. ....	36
<b>Tabla 3:</b> Reactivos para la preparación de la premezcla A y B para la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> .....	39
<b>Tabla 4:</b> Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> ....	40
<b>Tabla 5:</b> Reactivos para preparación de la premezcla A y B para la obtención de amplicones de <i>B. dendrobatidis</i> .....	42
<b>Tabla 6:</b> Perfil de temperatura para la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> con diferentes temperaturas de hibridación. ....	44
<b>Tabla 7:</b> Reactivos de la premezcla A y B para amplificación del control de proceso y de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> .....	47
<b>Tabla 8:</b> Perfil de temperaturas para la amplificación del control de proceso y de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> .....	48
<b>Tabla 9:</b> Especies de ranas muestreadas para el ensayo de PCR múltiple.....	52
<b>Tabla 10:</b> Reactivos de premezcla para la fase de amplificación en el ensayo de PCR múltiple. ....	55
<b>Tabla 11:</b> Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético en el ensayo de PCR múltiple. ....	56
<b>Tabla 12:</b> Reactivos para la preparación de la premezcla la amplificación de material genético de <i>Bd.</i> ....	59
<b>Tabla 13:</b> Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> mediante qPCR. ....	60
<b>Tabla 14:</b> Reactivos para la preparación de la premezcla la amplificación de material genético de <i>B. dendrobatidis</i> .....	62





**Tabla 15:** Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* mediante ..... 63

**Tabla 16:** Familias de ranas que amplificaron el control del proceso ..... 67

**Tabla 17:** Resultados del ensayo de PCR convencional múltiple ..... 68

**Tabla 18:** Resultados de la qPCR realizada en muestras de hisopados de ranas..... 69

**Tabla 19:** Cuadro de contingencia de 2x2 basado en los resultados obtenidos en PCR convencional múltiple y PCR en tiempo real ..... 70

**Tabla 20:** Prevalencia de la quitridiomycosis según las localidades estudiadas..... 70



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Signos clínicos y patología asociada a la infección por <i>B. dendrobatidis</i> .....	25
<b>Figura 2:</b> Productos amplificados del control de proceso bajo PCR convencional .....	64
<b>Figura 3:</b> Material genético de <i>B. dendrobatidis</i> amplificado. ....	65
<b>Figura 4:</b> Amplificación de cebadores de <i>B. dendrobatidis</i> .....	66
<b>Figura 5:</b> Productos de amplificación de la PCR múltiple durante la optimización de la temperatura media de hibridación.....	67
<b>Figura 6:</b> Porcentajes de amplificación del control de proceso.....	68
<b>Figura 7:</b> Resultados de un ensayo de PCR múltiple convencional. ....	68
<b>Figura 8:</b> Amplificaciones de muestras de la PCR en tiempo real.....	69



## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Muestreo de especímenes.....	81
<b>Anexo 2:</b> Resultados del ensayo de la PCR convencional múltiple.....	84
<b>Anexo 3:</b> Resultados del diagnóstico de <i>B. dendrobatidis</i> mediante PCR en tiempo real (qPCR)..	85
<b>Anexo 4:</b> Comparación de resultados de la PCR múltiple y qPCR.....	87
<b>Anexo 5:</b> Formato del ensayo de PCR convencional múltiple .....	88
<b>Anexo 6:</b> Toma de muestras a ranas mediante hisopado .....	89



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

**Bd:** *Batrachochytrium dendrobatidis*

**bp:** Base pair ( pares de bases).

**Buffer TAE:** solución de Tris- Acetato- EDTA.

**CCA:** Centro de conservación de anfibios Amaru.

**CP:** control de proceso

**dNTP's:** desoxirribonucleótidos trifostato

**LBM-FCA:** Laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

**MPM:** Marcador de peso molecular.

**TE:** solución de Tris y EDTA.

**Pmx:** Premezcla

**µl:** microlitros

**PCR:** Polimerase Chain Reaction, reacción en cadena de polimerasa.



### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Yo, Noemí Gabriela Torres Sarango, autora del trabajo de titulación "Implementación y evaluación de un ensayo de PCR para la detección del agente causal de la quitridiomycosis", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, septiembre del 2019

A handwritten signature in purple ink, appearing to read "Noemí", written over a horizontal line.

Noemí Gabriela Torres Sarango

C.I: 0105334304



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

Yo, Noemí Gabriela Torres Sarango, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Implementación y evaluación de un ensayo de PCR para la detección del agente causal de la quitridiomycosis", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, septiembre del 2019.

---

Noemí Gabriela Torres Sarango.

C.I: 0105334304



## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mi abuela Hortensia y a mi abuelo Eliecer, ustedes me enseñaron a ser fuerte y a tener curiosidad por la vida.

Dedicado a mi familia, amigas y en especial a mi amor Andrés, su invaluable ayuda y amor me permitió seguir adelante y ser resiliente durante este proceso.

En memoria de Mónica Vinueza Jarama.

**Noemí Torres Sarango.**



## **AGRADECIMIENTOS**

Mi infinito agradecimiento al profesor Antonio Vallecillo M., por su paciencia y tiempo, por los conocimientos compartidos y por creer en este proyecto. A quienes conforman el Laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA y a la Universidad del Azuay.

Al Ministerio del Ambiente, en especial a Carlos Valle P. por tan importante ayuda para conseguir el permiso de investigación.

A Fausto Siavichay P., Director del Centro de Conservación de Anfibios Amaru, por permitirme realizar mi voluntariado en el centro en donde nació la idea de esta investigación. Al Bioparque Amaru y a su director Ernesto Arbeláez.

A mis amigos del laboratorio por su grata colaboración, María Elena, Doris, Diego, Rolando y Carina.

A mis amigas Paola, Nadia, Sofía y Mara.

**Noemí Torres Sarango.**





## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

Los anfibios son una parte importante de los ecosistemas. Su rol ambivalente permite que sean presas y depredadores; en estado adulto son controladores de poblaciones de insectos que son su fuente de alimentación, y por otro lado, son un recurso alimenticio para aves, mamíferos, peces y reptiles, manteniendo a estas especies estables **(1)**. Desde el punto de vista cultural, las ranas y los sapos son asociados con la regeneración de la vida y la fertilidad **(2)**. Sin embargo, la importancia de su conservación trasciende estos puntos de vista ya que actualmente estos animales son fuentes potenciales de sustancias para el desarrollo de biomedicinas dentro del país, como por ejemplo los péptidos antimicrobianos encontrados en secreciones de la piel como las cruzioseptinas aisladas de una rana que se encuentra en el Ecuador, *Cruziohyala calcarifer* **(3)**. Las ranas se encuentran bajo riesgo de desaparecer y varios son los factores que han causado la disminución de comunidades de anfibios a nivel mundial. Los factores no actúan de manera aislada, pues se sugiere que la declinación de las poblaciones de anfibios se debe a la interacción de varios factores, muchos de ellos con efectos sinérgicos. Entre estas causas se encuentran la destrucción y/o modificación física del hábitat por acciones antropogénicas, el incremento de rayos UV-B, la acidificación de la lluvia, contaminantes químicos, la introducción de especies exóticas que muchas veces actúan como depredadores de anfibios, alteraciones en el clima y enfermedades **(4)**. Una de las enfermedades que ha ocasionado alta mortalidad en poblaciones de anfibios es la quitridiomycosis, causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, (*B. dendrobatidis*), la cual se encuentra dentro de la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal **(5)**. En Ecuador se ha reportado la presencia de *B. dendrobatidis* desde hace varios años; sin embargo es muy limitada o nula la información de la frecuencia y distribución de la enfermedad en las poblaciones de anfibios de vida libre o mantenidos en cautiverio dentro de centros de conservación. Lo anterior es consecuencia de un muy limitado y difícil acceso a las pruebas diagnósticas para esta enfermedad en el país, particularmente las de biología molecular que tienen como fundamento la amplificación y detección específica de ciertas regiones del genoma. Este desconocimiento pone en peligro el recurso genético y biológico de anfibios del país, sabiendo que Ecuador tiene un alto endemismo de anfibiofauna. Entonces, ¿cómo podemos proteger nuestro recurso biológico? Las ranas ecuatorianas deben ser protegidas con el aporte de conocimientos desde el ámbito de sanidad animal y el diagnóstico de enfermedades. Una de las maneras de afrontar las enfermedades infecciosas emergentes es a través de pruebas eficientes y confiables de diagnóstico, ya que este aspecto es un punto clave para mitigar y tomar acciones frente a una enfermedad. Varios fueron los métodos de diagnóstico desarrollados para la identificación del agente causal de la



quitridiomycosis en ranas, y a través del tiempo se logró llegar a la biología molecular como herramienta de diagnóstico directo. Durante el año 2004 se realizaron varios estudios de biología molecular, uno de los iniciales fue un ensayo de PCR convencional como un primer paso en la detección del patógeno, luego otros ensayos fueron validados y se consiguió obtener el diagnóstico mediante PCR en tiempo real **(6, 7, 8)**. El presente trabajo plantea la modificación, validación e implementación de un ensayo de PCR convencional para la amplificación y detección específica de ADN de *B. dendrobatidis* en muestras de anfibios con la integración de un control de proceso, el cual no se describe en otros trabajos de ensayos de PCR para el diagnóstico del quitridio. La OIE recomienda que para la validación de pruebas de diagnóstico basadas en la detección del ácido nucleico se adicione un control, en este caso un control que refiera a la especie hospedadora, que comprobaría que la muestra ha sido colectada correctamente **(9)**.

Para el desarrollo de esta investigación se planteó los siguientes objetivos y pregunta:

### **1.1 Objetivo general:**

Implementar y evaluar parámetros diagnósticos un ensayo de PCR convencional para la detección de material genético de *B. dendrobatidis*, para su aplicación en el diagnóstico de la quitridiomycosis en anfibios.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Implementar un ensayo de PCR convencional múltiple en el que se incluye un control de proceso basado en material genético de anfibios para la detección de material genético de *B. dendrobatidis* a partir de hisopados de animales sospechosos o con signología clínica compatible a la quitridiomycosis.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad diagnósticas del ensayo de PCR convencional para la detección material genético de *B. dendrobatidis* a partir de hisopados de animales susceptibles a la quitridiomycosis.
- Estimar la frecuencia y distribución de la infección por *B. dendrobatidis* en las poblaciones de anfibios incluidas en el estudio.

### **1.3 Pregunta de investigación:**

¿El ensayo de PCR convencional con la inclusión de control de proceso es capaz de diagnosticar de manera confiable la presencia de *B. dendrobatidis* en muestras de hisopados de animales susceptibles a esta micosis?



## CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 2.1 LOS ANFIBIOS.

Los anfibios son un grupo de vertebrados tetrápodos el cual se divide en tres Órdenes: el primero, el de los urodelos o caudados integrado por las salamandras y tritones; el segundo son los salientos o anuros conocidos también como ranas y sapos y el tercero son los gimnofiones o ápodos conformado por cecilias **(10)**. El nombre *anfibio* proviene de las palabras griegas *amphi* que significa “dos” y *bios* que quiere decir modo de vida, entendiéndose así que estos vertebrados tienen dos etapas diferentes de vida, es decir, pasan un período en el agua y otro en la tierra **(11)**. Actualmente hay más de 6000 especies de anfibios reconocidas, las cuales están distribuidas en diferentes regiones del mundo, excepto en la mayoría de islas oceánicas y en regiones muy frías y desérticas **(12)**.

Estos animales son ectodérmicos, es decir que para mantener sus procesos fisiológicos requieren del calor externo. Los anfibios tienen ciclos de vida complejos, la mayoría al pasar de larvas a la forma adulta sufren un proceso de transformación llamado metamorfosis. Estos vertebrados cuentan con dos características que influyen sobre el lugar que habitan y el modo de vida que pueden tener. Una de ellas es que poseen una piel permeable y delgada, y la segunda, es que los huevos carecen de una cascara y solo están protegidos por una membrana delgada. Estos hechos limitan a los anfibios a zonas donde hay agua disponible ya que requieren mantener el balance de agua corporal y la humedad de los huevos para su desarrollo **(13)**.

Los anfibios son importantes por varias razones. Algunas especies, al menos unas 212, son utilizadas como un recurso alimenticio y desde hace mucho tiempo que varios pueblos han incorporado a su cultura el uso de los anfibios dentro de la medicina tradicional y actualmente las secreciones de los anfibios, que pueden ser péptidos o proteínas, alcaloides, esteroides y bufadienólidos, son objeto de estudio para la ciencia. También, los adultos son los principales depredadores de insectos, y las larvas de algas y detritos, y a su vez otros vertebrados encuentran en los anfibios una fuente de alimento, siendo una parte importante a nivel ecológico **(12)**.

#### 2.1.1 Amenazas de los anfibios.

De 6260 especies conocidas al menos un 32% están amenazadas y se han registrado como extintas a 38 especies. La mayoría de especies amenazadas se encuentran en América Latina, por ejemplo en Colombia hay 214, en México 211 y en Ecuador 171. Cerca de unas 120 especies



no han sido encontradas en los últimos años, probablemente estén extintas y un 42% están disminuyendo sus poblaciones y con el tiempo podría incrementar el número de especies amenazadas **(14)**.

Entre la década de los 70 y 80 se reportó la desaparición y disminución de varias especies, sin encontrarse una causa exacta para estos eventos. Fue sorprendente para los investigadores que estos hechos ocurriesen en áreas protegidas en donde no hubo actividades humanas. Se han propuesto varias causas para la desaparición de anfibios **(15)**.

La destrucción y modificación del hábitat, la introducción de especies invasoras, la sobreexplotación comercial, la contaminación ambiental, el cambio climático y las enfermedades infecciosas emergentes, como la quitridiomycosis, son las principales causas de la disminución global de anfibios **(11)**. Algunos de estos factores pueden provocar problemas genéticos, alterar la reproducción, aumentar la pérdida de lugares de apareamiento y la disminución de recursos alimenticios que conllevan a la incapacidad de mantener viable una población, llevándola a su disminución e incluso a su desaparición **(16)**.

### **2.1.2 Las poblaciones de anfibios en el Ecuador.**

Ecuador cuenta con 594 especies de anfibios registradas, de las cuales 248 son endémicas y después de Brasil, Colombia y Perú, posee la cuarta anfibiafauna más diversa del mundo, habiendo una alta abundancia de anfibios por unidad de área (~2 especies por cada 1000 km cuadrados). El orden más abundante en especies es el de los anuros contando con 558 especies de ranas, el orden Gymnophiona y Caudata son menos diversos **(2)**. Lamentablemente, al igual que en el resto del mundo, los anfibios ecuatorianos han sufrido declinaciones en sus poblaciones los últimos años, siendo cada vez más escaso el encuentro de anfibios en sus rangos naturales **(17)**. En Ecuador un 36 % de las especies están amenazadas, ubicándose como el tercer país a nivel mundial en poseer un alto número de especies amenazadas **(12)**.

Entre las principales amenazas de la anfibiafauna ecuatoriana se encuentran el cambio climático, la modificación de hábitats y la deforestación para actividades agropecuarias, contaminantes como fertilizantes, metales pesados, herbicidas, fungicidas, etc., la introducción de especies exóticas como los peces salmónidos, *Salmo trutta* y *Onchorhynchus mykiss*, y de la rana toro, *Rana catesbeiana*, las cuales posiblemente compiten por recursos y son depredadores de ranas nativas, y finalmente la presencia del hongo patógeno *B. dendrobatidis*. Algunos de estos hechos, como la introducción de la rana toro, el dato del primer reporte para Ecuador de *B. dendrobatidis* y



los últimos avistamientos de ranas, como la especie *Atelopus ignescens*, ocurrieron a partir de 1980 (17).

## 2.2 ENFERMEDADES INFECCIOSAS EMERGENTES: QUITRIDOMICOSIS.

La quitridiomicosis es una enfermedad causada por el hongo *B. dendrobatidis*, uno de tres quitridios que afecta a vertebrados (18, 19). Este hongo infecta la piel de anfibios entre ellos anuros, urodelos y cecilias. Las ranas después de la metamorfosis se ven más afectadas que los renacuajos y salamandras (20). Esta enfermedad infecciosa se ha descrito en diversas regiones del mundo, ocasionando en ellas la disminución de las poblaciones de anfibios e incluso provocando la extinción de poblaciones silvestres, y las que se mantienen en cautiverio (21).

### 2.2.1 Historia de la enfermedad e identificación del agente causal.

En 1998 se reportó por primera vez la presencia de un hongo quitridial en la piel de ranas enfermas y muertas de localidades de Australia y Centroamérica, en donde sucedió una alta mortalidad de anfibios adultos con la consecuente disminución de sus poblaciones. El hongo fue observado mediante un microscopio electrónico de transmisión en cortes histológicos y por el estudio genético de su ácido desoxirribonucleico (ADN) se le clasificó como miembro del filo Chytridiomycota y la enfermedad fue denominada como quitridiomicosis (22). Longcore y colaboradores, en 1999 describieron la estructura y características del hongo el cual fue aislado de una rana flecha azul (*Dendrobates azureus*) del National Zoological Park en Washington. El patógeno fue nombrado entonces como *B. dendrobatidis*, una nueva especie de quitrido (23).

Se sugirió que África fue el país de origen de este quitrido. Mediante un estudio retrospectivo basado en histopatología se encontró al hongo en un espécimen de *Xenopus laevis* (*X. laevis*) de Sudáfrica colectado en 1938. Fue en esta especie en la que más se reportó la presencia de *B. dendrobatidis*. Algunas de las circunstancias que favorecieron la dispersión del hongo por el mundo fueron la intensiva captura y comercio de *X. laevis* después de 1935 para su uso como modelo biológico en investigación y el escape del patógeno hacia anfibios de otros países donde el hongo encontró nuevos hospederos, como la rana toro americana (*Rana catesbeiana*) (24).

Nuevas investigaciones han generado dos hipótesis sobre la aparición de esta enfermedad. La primera es conocida como “hipótesis de nuevo patógeno” y la segunda se denomina “hipótesis de patógeno endémico”(24, 27). La “hipótesis del nuevo patógeno” explica que el organismo llegó a nuevas zonas geográficas, encontrando poblaciones de anfibios como hospederos, para las cuales *B. dendrobatidis* era desconocido y por lo tanto carecían de inmunidad. Los argumentos de



la “hipótesis de patógeno endémico” manifiestan que el hongo ya estuvo presente en las poblaciones de anfibios y que cambios en el ambiente, así como en la susceptibilidad del hospedero provocaron que *B. dendrobatidis* tenga mayor virulencia **(18)**.

### 2.2.2 Impacto de la quitridiomicosis.

Con los primeros reportes de la enfermedad en Australia y América Central se conoció el efecto que tuvo sobre esas poblaciones de anfibios a tal punto de llevarlas a la extinción local. Este patógeno se volvió una amenaza para anfibios endémicos y en peligro de extinción de selvas de estas localidades, incluyendo a Sudamérica, y cada vez aparecieron más reportes de su presencia en diferentes familias y especies, siendo una potencial amenaza para ranas nativas de Europa, Asia, Madagascar, África, América y Oceanía **(26)**.

*B. dendrobatidis* es considerado una de las especies invasoras más destructivas por causar una gran pérdida de biodiversidad. El hongo quitrido logra sus efectos desastrosos gracias a que mantiene una alta patogenicidad, posee un amplio rango de hospederos entre los cuales se facilita la transmisión y persiste en el ambiente. Si bien en algunas especies es la principal causa de la declinación, en otras, se acompaña de factores como la destrucción de hábitats, cambios en el clima y presencia de especies invasivas. La quitridiomicosis, ha causado declinación de al menos 501 especies de anfibios, es decir, el 6.5 % de las especies descritas. Actualmente se sabe que de las 501, el 18% se asumen como extintas o ya lo están en la naturaleza. Los anuros en un 93% sufrieron declives y el 45% de afectaciones se ha dado en especies del género *Atelopus*, *Craugastor* y *Telmatobius* **(27)**.

Si bien el hongo quitrido ha sido responsable de la disminución y extinción de varias especies de anfibios en el mundo, existen reportes en los cuales el impacto es distinto y no está claro si el hongo es totalmente responsable de la declinación, por ejemplo, hay situaciones en las que *B. dendrobatidis* está presente y no causa la pérdida de un grupo de anfibios, en otros sitios ha estado antes de la disminución y hay casos en que después de un evento de declinación la infección continúa apareciendo dentro de una población sobreviviente sin causar su extinción **(28)**.

### 2.2.3 Distribución mundial de la enfermedad.

*B. dendrobatidis* es un patógeno de distribución global, encontrándose en los 5 continentes **(29)**. En el 2013, según Olson y colaboradores, *B. dendrobatidis* se encontraba ampliamente distribuido



por el continente Americano no así en Europa, África y Asia, donde tiene una distribución irregular. Los datos señalan que en 41 de 50 familias de anfibios y en 56 de 82 países muestreados se detectó la presencia del hongo **(30)**.

#### 2.2.4 Quitridiomycosis en Ecuador.

En Ecuador, una de las posibles causas de la disminución de las poblaciones de anfibios es por la quitridiomycosis. El dato más temprano de la presencia del hongo en Ecuador es de un *Atelopus bomolochos* (*A. bomolochos*) en la provincia de Cañar en 1980 siendo este el reporte más antiguo para Sudamérica, considerándose así que *B. dendrobatidis* es un patógeno introducido **(31)**. Este hongo también ha sido reportado en otras especies, como *Atelopus ignescens*, *Telmatobius niger*, *Gastrotheca pseustes* y *Hyla psarolaima* en un estudio que se llevó a cabo en los Andes entre las provincias de Carchi y Azuay; de esas especies, *A. ignescens*, *A. bomolochos* y *T. niger* han disminuido en número y una de las causas sugeridas es la quitridiomycosis **(32)**.

Según un estudio realizado por Proaño y colaboradores encontraron *B. dendrobatidis* en 4 especímenes de una especie no descrita de *Atelopus*. Durante una colecta en el 2005 y en abril del 2006 observaron en el campo varios sapos *Atelopus sp.*, con signos clínicos compatibles con quitridiomycosis, por lo que en efecto *B. dendrobatidis* es una amenaza para este género **(33)**.

En el Parque Nacional El Cajas, en la provincia del Azuay, se identificó *B. dendrobatidis* en renacuajos de *Gastrotheca pseustes* con una prevalencia del 7.9% y en un rango altitudinal estudiado entre los 2500 a 4200 m.s.n.m. Este hecho indica que el hongo puede crecer fuera del rango considerado apto para su crecimiento y por lo tanto subsiste en los Andes ecuatorianos **(34)**.

#### 2.2.5 Descripción general del agente causal.

*B. dendrobatidis* es un miembro del filo Chytridiomycota, clase Chytridiomycetes y orden Rhizophydiale **(22, 23)**. Es un hongo que habita el suelo húmedo o agua dulce como organismo saprofito o puede ser parásito de plantas, algas e invertebrados. En el ciclo de vida de este hongo se distinguen dos estadíos principales: las zoosporas, que son esporas móviles flageladas, y el estado de tallo reproductivo donde se forman más zoosporas **(18)**. La temperatura óptima para su crecimiento en cultivos en el laboratorio va desde los 17 a 25°C, lo que sugiere que en la naturaleza hay muchos lugares donde puede subsistir. Se ha observado que a 4°C puede crecer pero lo hace lentamente. *B. dendrobatidis* crece mejor si el pH del medio está entre 6 a 7 **(35)**.



### 2.2.6 Ciclo de vida de *B. dendrobatidis*.

El ciclo de vida de *B. dendrobatidis* en cultivos se presenta de la siguiente manera: las zoosporas luego de un corto periodo de motilidad se enquistan, el flagelo es reabsorbido y se produce una pared celular. Posterior al enquistamiento toma el nombre de esporangio joven o germinado el cual forma ramificaciones rizoides para mantener juntos a los esporangios para un mejor crecimiento en grupo. El citoplasma del esporangio o tallo sufre cambios por la división mitótica para la formación de nuevas zoosporas flageladas, ahora se denomina zooesporangio. En ocasiones los tallos presentan dos alternativas de desarrollo, la primera con un solo esporangio (monocéntrico) y la otra donde hay más de un esporangio, separados por un septo (colonial). Durante la maduración de cada zooesporangio se forman papilas de descarga por donde y en condiciones de humedad se liberarán las nuevas zoosporas al ambiente **(36)**.

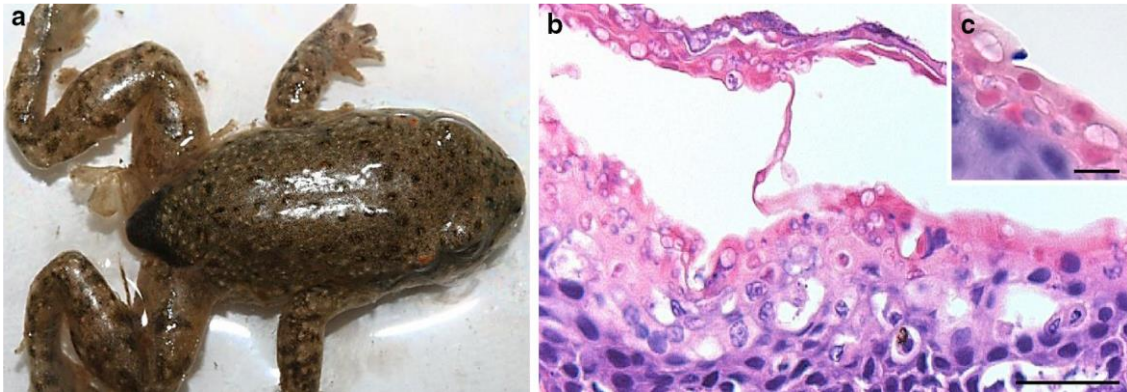
En la piel de los anfibios el desarrollo es similar al observado en cultivos. Durante el proceso endobiótico las zoosporas flageladas se enquistan en la superficie de células epiteliales queratinizadas de la piel; el flagelo se reabsorbe y se forma la pared celular. El quiste germina y forma un tubo germinal que le permite invadir capas profundas de la epidermis. De la punta del tubo germinal se forma un esporangio y así el hongo se dispersa dentro de las células del estrato corneo y granuloso. Con la diferenciación de células profundas de la epidermis los esporangios inmaduros son llevados hacia la superficie de la piel. Una vez ahí, con la formación de las papilas de descarga del esporangio maduro, las nuevas zoosporas pueden ser liberadas al ambiente **(18)**.

### 2.2.7 Signología.

En renacuajos el signo clínico más evidente de la infección es la despigmentación de las zonas queratinizadas del aparato bucal, lo que provoca en ellos problemas como la desnutrición y un desarrollo anormal **(37)** en algunos casos los renacuajos nadan en forma anormal y es posible observar la ausencia de signología **(38)**. En los adultos infectados se pueden observar lesiones dermatológicas como decoloración, hiperqueratosis **(37)** aumento en la frecuencia de la muda de la piel, eritema en el vientre y en las patas **(39)**. Los animales enfermos están aletargados y pasan mayor tiempo en el agua, se ha reportado una forma hiperaguda de la enfermedad causando la muerte en un corto periodo de tiempo **(38)**. Algunos individuos convulsionan, presentan anorexia y posturas anormales, por ejemplo las patas traseras extendidas **(37)** o permanecen con la zona ventral del cuerpo elevada evitando el contacto con el sustrato **(39)**. Hay pérdida del reflejo de reincorporación o de postura y no intentan huir ante estímulos y además se



encuentran deshidratados. Se desarrollan infecciones secundarias por bacterias y otros hongos, que causan en la piel ulceraciones y petequias, e incluso puede presentarse congestión visceral (20).



**Figura 1** : Signos clínicos y patología asociada a la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*; **a.** Sapo infectado (*Alytes obstetricans*) que muestra una postura anormal (patas traseras en abducción) y desprendimiento de piel; **b.** Corte histológico del parche de absorción de la misma rana infectada; la infección se caracteriza por hiperqueratosis epidérmica difusa e hiperplasia con la presencia de numerosos zoosporangios en diversas etapas de maduración; **c.** Detalle de los zoosporangios con septos intracelulares. **Fuente:** (5).

### 2.2.8 Control y tratamiento de la enfermedad.

Se sabe que la mayoría de especies son muy susceptibles a esta micosis, sin embargo algunas no muestran signos clínicos, convirtiéndose en una fuente de infección para el resto de anfibios dentro de una colección por lo que es necesario su diagnóstico y la aplicación del tratamiento para controlar la dispersión del patógeno (40). Dentro de las medidas de bioseguridad aplicables en cautiverio se encuentra el tratamiento del agua, evitar el escape de animales vivos, higiene del personal y desinfección de los materiales que ingresen o salen de la instalación. Los anfibios destinados a reintroducción deben estar libres de *B. dendrobatidis* y aquellos que ingresen serán puestos en cuarentena y muestreados para diagnosticar el hongo. Este organismo se inactiva con sustancias desinfectantes como Etanol al 70%, Hipoclorito de sodio al 1%, Virkon a concentración de 2mg/ml, permanganato de sodio al 1% y solución de 1 en 5000 de Trigene (19).

El tratamiento con Itraconazol es el más utilizado, pero se debe evitar el uso en postmetamorfos y renacuajos (39). Los baños de Itraconazol son utilizados para el tratamiento de animales con signos clínicos, para infecciones subclínicas y como tratamiento preventivo. Se aplica mediante baños diarios de 5 minutos durante 11 días. La solución es de Itraconazol al 0,01%, diluido en solución salina al 0,6% o en solución de Ringer para anfibios o incluso en agua local (40).



A pesar de ser efectivo, un solo tratamiento no es suficiente y las reinfecciones suelen ser comunes especialmente por no aplicar medidas de bioseguridad **(41)**. En un estudio realizado por Brannelly y colaboradores se obtuvo que una baja concentración de itraconazol al 0,0025% durante 6 días es efectiva y presentó una reducida mortalidad en metamorfos, por lo que esta alternativa se podría aplicar con especies sensibles para reducir los efectos tóxicos de este antimicótico **(42)**.

### **2.2.9 Diagnóstico del hongo quitrido.**

El diagnóstico del patógeno es importante sobre todo en el período de cuarentena de los animales en cautiverio. La mayoría de especies sensibles a la infección presentan signos pero otras tienen infecciones subclínicas y su pronta identificación permite tener un mejor control de los anfibios que son reservorios del patógeno y así evitar su dispersión dentro de una colección **(40)**.

#### **2.2.9.1 Citología y análisis de un montaje húmedo.**

La observación de la muda de piel bajo microscopio permite identificar las estructuras del hongo y puede ser obtenida mediante raspado cutáneo. Se coloca la muestra en un portaobjetos y se agrega 1 o 2 gotas de agua o solución salina más el cubreobjetos. La muestra puede ser teñida con azul algodón de lactofenol, rojo congo, KOH al 10% o DipQuick para tener una visualización más clara. En estas muestras se observan esporangios intracelulares redondos u ovalados en agrupaciones. Los esporangios de la piel mudada con frecuencia suelen estar vacíos pero también se pueden encontrar tallos con zoosporas y con el septo interno **(19,40)**.

#### **2.2.9.2 Diagnóstico mediante histopatología.**

El diagnóstico histopatológico es aplicable a muestras de piel preservadas en etanol o formalina de animales muertos, así como cortes de dedos y piel mudada de anfibios cautivos o de vida libre y en el caso de renacuajos se toman tejidos del disco oral. Los cortes de 5  $\mu\text{m}$  se tiñen con Hematoxilina y Eosina. Se puede observar en el estrato corneo las formas esféricas de los zoosporangios con paredes eosinófilas con las respectivas papilas de descarga y zoosporas que suelen ser basófilas. También están presentes tallos vacíos y septados. Las lesiones relacionadas con la quitridiomycosis son hiperqueratosis, hiperplasia epidermal y diferentes grados de inflamación y degeneración epidermal **(19,40,43)**.

#### **2.2.9.3 Inmunohistoquímica.**

Berger *et al.*, en el 2002 generaron anticuerpos policlonales en conejos y ovejas con el fin de utilizarlos en una prueba de inmunoperoxidasa indirecta en respuesta a la necesidad de



desarrollar herramientas diagnósticas más confiables. Esta prueba es más sensible que el estudio histopatológico con tinciones de Hematoxilina-Eosina, sin embargo no es específico ya que existe reacción cruzada con otros hongos del filo Chytridiomycota y levemente con hongos de otros filos, aunque algunos no afectan a los anfibios **(44)**.

#### **2.2.9.4 Aislamiento microbiológico.**

Este se puede realizar a partir de muestras de anfibios muertos, moribundos y del disco oral de renacuajos. Se toman porciones de piel delgadas, se examinan con microscopio para buscar esporangios en las células epidérmicas y se colocan en el medio de cultivo mTGh (Tryptona, Hidrolizado de gelatina, Agar) con antibióticos. Luego las muestras de piel son colocadas nuevamente en placas con mTGh y se incuban entre 17 a 23°C. El crecimiento es suficiente para ser observado en 2 semanas a 1 mes. Las colonias obtenidas se pueden transferir a un medio con Tryptona al 1% y para generar stocks que se mantienen a 5°C, los cuales pueden permanecer viables bajo estas condiciones durante cuatro meses **(36,15)**.

#### **2.2.9.5 Biología molecular: amplificación y detección de ácidos nucleicos.**

El diagnóstico mediante técnicas de biología molecular es apropiado para realizar en anfibios durante la cuarentena, en casos de reintroducción de especies, estudios de prevalencia en poblaciones cautivas o libres. Las muestras para PCR se pueden obtener mediante hisopado, baños de agua o muestras de tejidos como dedos del pie o cortes del aparato bucal de renacuajos; entre estos se prefiere el hisopado porque es la técnica menos invasiva **(40)**.

En 2004 Annis y colaboradores describieron un ensayo de PCR convencional para detectar material genético del hongo con el desarrollo de oligonucleótidos específicos; Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTACAG-3') y Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'). El ensayo permite amplificar un fragmento de 300 bp específicos de ADN ribosómico, con un límite de detección de 10 zoosporas **(6)**. En el mismo año Boyle y colaboradores implementaron el diagnóstico de *B. dendrobatidis* mediante PCR en tiempo real, lo que permite detectar infecciones leves, en fases iniciales, inclusive 7 o 14 días antes de que la infección pueda ser detectada por el método de histopatología **(7)**.

Tres años más tarde, Hyatt y colaboradores realizaron un trabajo para validar el ensayo de PCR TaqMan, evaluando la sensibilidad, especificidad, repetitividad y reproductividad de la prueba, estableciendo también que el mejor método de muestreo es el hisopado, (hisopos de rayón de punta fina) ya que proporciona una mejor recuperación de ADN **(8)**.



### 2.2.9.6 Inmunoensayo de flujo lateral

Se desarrolló a través de la obtención de un anticuerpo monoclonal de la clase IgM, el 5C4, el cual se pega a antígenos específicos del hongo formados de glicoproteínas. Los antígenos se encuentran en la superficie de las zoosporas, en los esporangios y zooesporangios, lo que permite detectar la presencia de *B. dendrobatidis* y *B. salamandrivorans* en sus diferentes estadios en tan solo 15 minutos. Sin embargo hay una reacción cruzada con el hongo *Homolaphlyctis polyrhiza*. El ensayo es capaz de detectar correctamente antígenos en tejidos guardados, hisopados y en muestras que dieron negativas a qPCR. A pesar de ser una prueba muy rápida y eficiente para la detección temprana del hongo quítrido, es necesario complementar los resultados con ensayos de PCR para confirmar su presencia y cuando sea necesario diferenciar la especie del hongo (46).

## 2.3 VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS BASADAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR.

La lucha contra las enfermedades infecciosas requiere del mejoramiento de los métodos de diagnóstico con el fin de que sean más específicos y mejor estandarizados (47), y las pruebas de diagnóstico basadas en la detección de ácidos nucleicos son muy sensibles y ofrecen varias ventajas. Los ácidos nucleicos son fáciles de obtener del tejido infectado, pueden ser detectados y medidos en cantidades muy pequeñas, además que las secuencias de ADN del genoma del patógeno son específicas y tales secuencias pueden amplificarse para incrementar su cantidad y ser analizadas (48).

Generalmente, la aplicación de nuevas técnicas de diagnóstico es muy limitada en países en vías de desarrollo. La implementación de la reacción en cadena de polimerasa, PCR, al diagnóstico de enfermedades se realiza de manera casi restringida a laboratorios que cuentan con fondos, instalaciones, equipos y personal preparado. La PCR se realiza en condiciones muy limpias, con protocolos de desinfección y cuartos adecuados, ya que la contaminación con cantidades diminutas de ADN extraño puede producir resultados falsos positivos (47).

El nivel de optimización y exigencia en la implementación de los métodos de diagnóstico molecular varía mucho de un laboratorio a otro, por ejemplo están aquellos que sencillamente reproducen un ensayo ya descrito dentro de la literatura, lo cual ofrece poco control de calidad, y aquellos que evidentemente realizan una validación técnica y control de calidad de los procedimientos, evaluando su especificidad, sensibilidad y valores predictivos positivos y negativos, entre otras características (49). La optimización del ensayo incluye una serie de



procedimientos experimentales y la evaluación de los datos generados con el fin de determinar un protocolo fijo para el uso, el tipo y la cantidad de controles necesarios y conocer las especificaciones requeridas de los reactivos y equipos **(47)**.

La validación puede incluir una comparación con otros métodos, con referencias estándar, con otros laboratorios usando el mismo ensayo **(47)**. Dentro de los principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas se menciona a la sensibilidad y especificidad analítica, entre otros aspectos, como pasos que permiten determinar la idoneidad de la prueba en desarrollo, así como su rendimiento analítico y diagnóstico **(50)**.

### **2.3.1 Sensibilidad analítica.**

La sensibilidad analítica (ASe) es la capacidad de la prueba de detectar una baja concentración de una sustancia determinada dentro de una muestra biológica. La ASe guarda relación con el límite de detección (LoD) o concentración mínima detectable, por lo tanto un ensayo de PCR tiene una alta sensibilidad cuando detecta las más bajas concentraciones de ácidos nucleicos **(49)**. Clínicamente, esto significa que el ensayo es idóneo para encontrar el genoma de un patógeno específico en un animal enfermo **(47)**.

### **2.3.2 Especificidad analítica**

La especificidad analítica (ASp) es la capacidad de la prueba de diferenciar al analito deseado de otros que no son de interés **(50)**, en este caso se trata de la correcta detección del genoma del patógeno, lo que clínicamente significaría que un animal sano sea clasificado como tal **(47)**. La prueba puede ser de carácter exclusivo al detectar una sola secuencia genética y que no sea parte de otros microorganismos o de cepas del microorganismo determinado, lo que otorga a la prueba una alta ASp. Si la prueba es capaz de detectar una secuencia del genoma que está en todas las cepas o especies del microorganismo a detectar se habla de que es inclusiva y sirve como prueba cribado. También debe comprobarse su capacidad de descartar cepas no patógenas que no sean de utilidad **(9)**

### **2.3.3 Uso de controles de proceso**

La optimización del método del ensayo que se aplicará en futuros análisis de rutina es un paso importante para la validación de una prueba. A parte de tomar en cuenta que los ensayos se realicen dentro de instalaciones adecuadas, es recomendable que el método de extracción del ácido nucleico sea robusto, también que los procedimientos se optimicen para su aplicación de la



prueba en el laboratorio, así como la inclusión de controles para la PCR para comprobar que la prueba rinde como se espera **(9)**.

Durante una prueba de diagnóstico, basada en PCR, suelen presentarse problemas en sus diferentes etapas, produciéndose resultados falsos negativos. Los puntos que requieren más atención y son más difíciles de manejar son el fracaso de la extracción de ADN y la inhibición de la reacción. Por lo tanto el uso de un control interno oportuno ayuda a identificar resultados falsos negativos, reduciendo grandemente el riesgo de un diagnóstico erróneo. El control se debería incluir en todo el proceso del ensayo, siendo capaz de detectar fallos durante la extracción y amplificación **(49)**.

#### **2.3.4 Control basado en material genético del hospedador.**

Con la inclusión de este control se comprueba que el hospedero se ha muestreado adecuadamente, es decir, que el elemento para tomar la muestra estuvo en contacto con la especie de hospedadora, así, la muestra contiene ácido nucleico el cual será procesado para su extracción. Su uso es recomendado cuando se realiza un muestreo indirecto como las obtenidas mediante hisopado **(9)**.



## CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Ubicación del estudio y unidad de análisis

La implementación de la prueba de PCR convencional múltiple se realizó en el Laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. Las muestras se obtuvieron del Centro de Conservación de Anfibios-Amaru (CCA), ubicado en el kilómetro 10 ½ de la vía Cuenca-Azogues. Como parte de un monitoreo de ranas desarrollado por el CCA en otros sectores de Cuenca como Monay-Baguanchi y Challuabamba, se obtuvo hisopados de piel de anfibios. Además durante un monitoreo en campo realizado por el Blgo. Fausto Siavichay, se accedió y se tomó muestras de la localidad de Altarurco y Cerro Negro ubicados en el cantón Sigsig. Se obtuvo en total 85 muestras duplicadas.

El duplicado de las muestras fueron sometidas a PCR en tiempo real en la Universidad del Azuay. Las familias de anfibios estudiadas fueron: Craugasteridae, Bufonidae, Dendrobatidae, Hylidae, Centrolenidae, Hemifractidae y Mycrohylidae. Adicionalmente para los primeros ensayos se requirió de los cortes de los pies de ranas de muertas de las especies *Atelopus exiguus* y *Gastrotheca aff pseustes*.

### 3.2 Solicitud del permiso de investigación.

Se realizó el trámite correspondiente con el Ministerio del Ambiente de Ecuador para obtener el Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos registrado con código **Nro. MAE-DNB-CM-2018-0081** con fines de investigación científica ya que los anfibios ecuatorianos son considerados un recurso genético del país.

### 3.3 Obtención de un control de proceso válido.

#### 3.3.1 Procedimiento para la colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras de tejidos de animales susceptibles o con signología clínica compatible con quitridiomycosis.

##### 3.3.1.1 Materiales

#### A) Biológicos

- Anfibios postmetamorfos de la clase Anura.

#### B) Reactivos y soluciones

- Etanol al 70% para conservación de la muestra.



- Gel desinfectante manos.
- Solución de Hipoclorito de sodio, formada de 1 parte de cloro comercial y 9 partes de agua.

### **C) Equipos y otros materiales**

- Guantes de látex libres de polvo o guantes de Nitrilo.
- Cooler o caja para transporte de muestras.
- Esferos y marcadores.
- Frascos de vidrio.

#### **3.3.1.2 Método**

Dos individuos de las especies de *Atelopus exiguus* (*A. exiguus*) y *Gastrotheca aff. pseustes* (*G. aff. pseustes*) provenientes del CCA, las cuales murieron con signología compatible a quitridiomycosis, fueron conservadas por separado en frascos de vidrio con Etanol al 70 % y mantenidas en refrigeración (4 °C) en el LBM-FCA para realizar los primeros ensayos de optimización del proceso de amplificación.

### **3.3.2 Procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico total de anfibios.**

#### **3.3.2.1 Materiales**

##### **A) Biológicos**

- Tejidos de ranas

##### **B) Reactivos**

- Solución de lisis [50 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM de EDTA, 700 mM de NaCl, 1 % de CTAB y 0,1 % de  $\beta$ -mercaptoetanol].
- Solución de proteinasa K 20X
- Solución de RNAsa A 100X
- Solución de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico 25:24:1.
- Etanol absoluto.
- Solución de 70 % de etanol.
- Solución T.E 10:1.

##### **C) Equipos y otros**

- Platina de calentamiento y agitación magnética.
- Potenciómetro.
- Tubos eppendorf 2 ml.





- Microcentrífuga refrigerada.
- Micropipetas de diversos volúmenes.
- Puntas de pipetas 1 ml.
- Equipo de filtración ( $\varnothing$  0.22 nm).
- Guantes.
- Vórtex.
- Autoclave.
- Refrigerador (4 °C).
- Congeladores de - 20 °C y - 80 °C.
- Probetas y recipientes para soluciones.

### 3.3.2.2 Métodos

**Paso 1:** Se retiró las ranas mantenidas en refrigeración para permitir que alcancen una temperatura ambiente de entre los 23 – 25 °C. Se cortó 1 pie de *A. exiguus* y uno de *G. aff. pseustes* y cada muestra se colocó en un tubo Eppendorf de 2 ml.

**Paso 2:** Se adicionó 200  $\mu$ l de la solución de lisis y se dejó 24 horas en reposo y refrigeración. Al día siguiente, después de permitir que alcance la temperatura ambiente, se adicionó 4  $\mu$ l de la solución de Proteinasa K y 1  $\mu$ l de RNAsa A, se mezcló en vórtex y luego se incubó durante 1 hora a 60 °C.

**Paso 3:** Después de la incubación se adicionó 200  $\mu$ l de la solución Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico 25:24:1 y se mezcló en vórtex durante 25 segundos.

**Paso 4:** Se centrifugaron las muestras a 12,000 x *g* durante 10 min a 4°C. Se colectó 200  $\mu$ l de sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml.

**Paso 5:** Se adicionó 2,5 volúmenes, es decir 400  $\mu$ l de etanol frío (4 °C), se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente a 12,000 x *g* durante 10 min a 4 °C.

**Paso 6:** Se retiró el sobrenadante mediante decantación y se eliminó la mayor cantidad con ayuda de papel absorbente. Se agregó 400  $\mu$ l de etanol al 70 %, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 x *g* por 10 min a 4 °C.

**Paso 7:** Se decantó el sobrenadante y se retiró lo más posible con la ayuda del papel absorbente. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y protegida del polvo hasta el siguiente día.



**Paso 8:** La pastilla fue resuspendida en 25 µl de solución de TE 10:1 y las muestras de ADN total fueron almacenadas a – 20 °C.

### 3.3.3 Preparación de las reacciones de amplificación de material genético de anfibios

#### 3.3.3.1 Materiales

##### A) Biológicos

- ADN total de anfibios.

##### B) Reactivos y soluciones

- Solución de oligonucleótidos de anfibios.
  - Forward-1: Chmf4 (5'-TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATCGG-3').
  - Reverse- 1: Chmr4 (5'-ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA-3') (51).
  - Forward-2: ANFFor (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3')
  - Reverse-2: ANFRev (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (52).
- Solución de Desoxirribonucleótidos trifosfatos o dNTP's.
- Enzima platinum **Taq** ADN polimerasa.
- Buffer de PCR 10X.
- Solución de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>) a 50 mM.

##### C) Equipos y otros materiales

- Puntas para pipetas de 1 ml, 200 µl, 20 µl.
- Micropipetas.
- Tubos eppendorf 1.5 ml.
- Tubos para PCR de 0.2 ml.
- Congeladores a - 20 °C y 4 °C.
- Vórtex.
- Cabina de PCR.
- Centrífuga.

#### 3.3.3.2 Métodos

**Paso 1:** Se retiraron los reactivos y muestras de ADN total de los sitios de almacenado (- 20 °C) y se permitió su descongelamiento



**Paso 2:** En un tubo Eppendorf de 1,5 ml se colocó los siguientes reactivos en el orden indicado para un volumen de 22,6 µl por cada reacción. Se preparó dos premezclas, A y B de la siguiente manera:

**Tabla 1:** Reactivos de la premezcla A y B para amplificación de material genético de anfibios de las especies *A. exiguus* y *G. aff. pseustes*.

Reactivos de la pmx A	Cantidad por reacción	Total para 10 reacciones
Agua grado biología molecular	18,25 µl	182,50 µl
Buffer de reacción 10X	2,50 µl	25 µl
dNTP's a 10 mM	0,25 µl	2,50 µl
MgCl <sub>2</sub> a 50 mM	1 µl	10 µl
Forward- 1: Chmf4 a 100 µM	0,20 µl	2 µl
Reverse-1: Chmr4 a 100 µM	0,20 µl	2 µl
Enzima platinum Taq ADN polimerasa	0,20 µl	2 µl
<b>Total</b>	<b>22,6µl</b>	<b>226 µl</b>
Reactivos de la pmx B	Cantidad por reacción	Total para 10 reacciones
Agua grado biología molecular	18,25 µl	182,50 µl
Buffer de reacción 10X	2,50 µl	25 µl
dNTP's a 10 mM	0,25 µl	2,50 µl
MgCl <sub>2</sub> a 50 mM	1 µl	10 µl
Forward- 2: ANFFor a 100 µM	0,20 µl	2 µl
Reverse-2: ANFRev a 100 µM	0,20 µl	2 µl
Enzima platinum Taq ADN polimerasa	0,20 µl	2 µl
<b>Total</b>	<b>22,6 µl</b>	<b>226 µl</b>

**Paso 3:** Se mezcló la premezcla con ayuda del agitador o vórtex.

### 3.3.4 Procedimiento para la amplificación de material genético de anfibios

#### 3.3.4.1 Materiales

##### A) Reactivos y soluciones:

- Premezcla A
- Premezcla B
- ADN total de *A. exiguus* y *G. aff. pseustes*.

##### B) Equipos y otros materiales:

- Termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1).



### 3.3.4.2 Métodos

**Paso 1:** Utilizamos veinte tubos para PCR. En 10 tubos colocamos 23 µl de la premezcla A y en los restantes 23 µl de la premezcla B.

**Paso 2:** De los diez tubos con la premezcla A, en cinco de ellos, se colocó 2 µl de ADN total de la especie *A. exiguus* y en los sobrantes 2 µl de ADN total de *G. aff. pseustes* en cada uno. Así obtuvimos diez reacciones, cada una con un volumen total de 25 µl.

**Paso 3:** Para los diez tubos con la premezcla B, en los cinco primeros se adicionó de igual manera 2 µl de ADN total de *A. exiguus* por cada tubo y en los restantes 2 µl de ADN total de *G. aff. pseustes*.

**Paso 4:** Se colocó los 20 tubos en el termociclador y se programó los siguientes ciclos y perfil de temperaturas. Para conocer una temperatura de hibridación adecuada se programó 5 distintas temperaturas:

**Tabla 2:** Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético de anfibios.

Paso:		Tiempo (min', seg'')	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial		5' 00''	95 °C
35 ciclos	Desnaturalización	00' 30''	95 °C
	Alineamiento	00' 30''	62 °C
	Extensión	00' 45''	72 °C
Extensión final		05' 00''	72 °C
Almacenamiento		∞	4 °C

**Paso 5:** Se retiró los tubos y se procedió con la visualización de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.

### 3.3.5 Detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio y fotodocumentación de los resultados.

#### 3.3.5.1 Materiales

##### A) Reactivos y soluciones

- Agarosa.
- Buffer TAE [Tris, Acetato, EDTA.
- Bromuro de etidio.
- Buffer de carga [Glicerol, Xlencianol y Azul de Bromofenol].



- Marcador de peso molecular

## **B) Equipos y otros materiales**

- Puntas de pipeta de 200  $\mu$ l y 20  $\mu$ l.
- Micropipetas.
- Cámara de electroforesis.
- Balanza.
- Probetas y recipientes para soluciones
- Espátulas
- Guantes de nitrilo
- Horno microondas
- Fotodocumentador (BioRad Modelo: Gel Doc XR+).

### **3.3.5.2 Métodos**

**Paso 1:** En un matraz Erlenmeyer se colocó 90 ml del buffer TAE. Se pesó 0,9 gr de agar y se mezcló con el buffer TAE para obtener un gel al 1% de agar. La mezcla se colocó en la platina de agitación magnética por unos 2 minutos y luego fue calentada en el horno microondas durante 30 segundos y se repitió el calentamiento hasta lograr una adecuada homogenización.

**Paso 2:** Se enfrió la mezcla para colocar 3  $\mu$ l de Bromuro de etidio en la mezcla (1 $\mu$ l de Bromuro de etidio por cada 30 ml de la mezcla Buffer TAE 1X y agarosa). Se vertió la mezcla en la bandeja para gel, se colocaron dos peines, uno arriba y otro abajo del gel y se esperó a que solidifique.

**Paso 3:** La bandeja con el gel solidificado se ubicó en la cámara de electroforesis, se cubrió con la solución TAE y se retiraron los peines que forman los pocillos. Se obtuvo un gel dividido en dos partes.

**Paso 4:** En cada tubo con los productos amplificados se adicionó 5  $\mu$ l del buffer de carga, se mezcló y se tomó 10  $\mu$ l para cargar cada pocillo. En los pocillos de arriba se colocaron las muestras de *A. exiguus* y en los de abajo las pertenecientes a *G. aff. pseustes*. Los últimos pocillos de la parte superior e inferior del gel se utilizaron para colocar 6  $\mu$ l de marcador de peso molecular de 100 bp.

**Paso 5:** Se encendió la cámara de electroforesis durante 45 minutos a un voltaje de 100. Una vez terminado el tiempo se comprobó que las bandas hayan corrido lo suficiente como para ser observadas.



**Paso 6:** Se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se ubicó en el fotodocumentador para visualizar la imagen desde el computador. Se realizó los ajustes necesarios para obtener una buena calidad de imagen.

**Paso 7:** Se visualizó las bandas de productos amplificados y se las clasificó de acuerdo al tamaño de referencia para cada par de oligonucleótidos.

### 3.4 Detección de material genético de *B. dendrobatidis* en muestras de dos especies de ranas.

#### 3.4.1 Preparación de reacciones para la amplificación de material genético de *Bd* en muestras de tejido de dos ranas.

##### 3.4.1.1 Materiales

##### A) Reactivos y soluciones

- Solución de oligonucleótidos de *Bd*:
  - Forward-1: ITS1-3 *Bd* (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3').
  - Reverse-1: 5.8S *Bd* (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA-3'). **(8)**
  - Forward-2: *Bd*1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3').
  - Reverse-2: *Bd*2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3') **(6)**.
- Solución de dNTP's
- Enzima platinum **Taq** ADN polimerasa
- Buffer de PCR 10X.
- Solución de Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$ ) a 50 mM.

##### B) Equipos y otros materiales

- Puntas para pipetas de 1 ml, 200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l.
- Micropipetas.
- Tubos Eppendorf 1.5 ml.
- Tubos para PCR de 0.2 ml.
- Congeladores a - 20 °C y 4 °C.
- Vórtex.
- Guantes.
- Cabina de PCR.



### 3.4.1.2 Métodos

**Paso 1:** Se realizó una premezcla A y B con los siguientes reactivos:

**Tabla 3:** Reactivos para la preparación de la premezcla A y B para la amplificación de material genético de *Bd*.

Reactivos para la pmx A	Cantidad por reacción	Total para 5 reacciones
Agua grado biología molecular	18,25 µl	91,25 µl
Buffer de reacción 10X	2,50 µl	12,5 µl
dNTP's a 10 mM	0,25 µl	1,25 µl
MgCl <sub>2</sub> a 50 mM	1 µl	5 µl
Forward - 1: ITS1-3 <i>Bd</i> a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Reverse - 1: 5.8S <i>Bd</i> a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Enzima platinum Taq ADN polimerasa	0,20 µl	1 µl
<b>Total</b>	<b>22,6 µl</b>	<b>113 µl</b>
Reactivos para la pmx B	Cantidad por reacción	Total para 5 reacciones
Agua grado biología molecular	18,25 µl	91,25 µl
Buffer de reacción 10X	2,50 µl	12,5 µl
dNTP's a 10 mM	0,25 µl	1,25 µl
MgCl <sub>2</sub> a 50 mM	1 µl	5 µl
Forward- 2: <i>Bd</i> 1a a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Reverse - 2: <i>Bd</i> 2a a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Enzima platinum Taq ADN polimerasa	0,20 µl	1 µl
<b>Total</b>	<b>22,6 µl</b>	<b>113 µl</b>

### 3.4.2 Procedimiento para la amplificación de material genético de *Bd* a partir de tejidos de ranas.

#### 3.4.2.1 Materiales

##### A) Reactivos y soluciones:

- Premezcla A y B.
- ADN total de *A. exiguus* y *G. aff. pseustes*.

##### B) Equipos y otros materiales:

- Termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1)



### 3.4.2.2 Métodos

**Paso 1:** En cuatro tubos para PCR colocamos 23 µl de la premezcla A y en otros cuatro tubos agregamos 23 µl de la premezcla B en cada uno.

**Paso 2:** En los tubos con la premezcla A, se colocó un volumen de 2 µl de ADN total de *A. exiguus* en los dos primeros tubos y en otros dos, 2 µl de ADN total de *G. aff. pseustes*.

**Paso 3:** En los tubos que contenían la premezcla B se agregó a dos tubos, 2 µl de ADN total de la especie *A. exiguus* y en otros dos, 2 µl de ADN total de *G. aff. pseustes* en cada uno.

**Paso 4:** Los 8 tubos fueron colocados en el termociclador con el siguiente perfil de temperatura:

**Tabla 4:** Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis*.

Paso:		Tiempo (min', seg''):	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial		5' 00''	95 °C
35 ciclos	Desnaturalización	00' 30''	95 °C
	Alineamiento	00' 30''	60°C para Pmx A 50 °C para Pmx B
	Extensión	00' 45''	72 °C
Extensión final		05' 00''	72 °C
Almacenamiento		∞	4 °C

**Paso 5:** Se retiró los tubos y se procedió con la visualización de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.

### 3.4.3 Detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio y fotodocumentación de los resultados.

#### 3.4.3.1 Materiales

##### A) Reactivos y soluciones

- Agarosa.
- Buffer TAE [Tris. Acetato, EDTA].
- Bromuro de etidio.
- Buffer de carga [Glicerol, Xilencianol y Azul de Bromofenol].
- Marcador de peso molecular





## B) Equipos y otros materiales

- Puntas de pipeta de 200  $\mu$ l y 20  $\mu$ l.
- Micropipetas.
- Cámara de electroforesis.
- Balanza.
- Probetas y recipientes para soluciones
- Espátulas
- Guantes de nitrilo
- Horno microondas
- Fotodocumentador (BioRad Modelo: Gel Doc XR+).

### 3.4.3.2 Métodos

**Paso 1:** En un matraz Erlenmeyer se colocó 90 ml del buffer TAE. Se pesó 0,9 gr de agar y se mezcló con el buffer TAE para obtener un gel grande al 1% de agar. La mezcla se colocó en la platina de agitación magnética por unos 2 minutos y luego fue calentada en el horno microondas durante 30 segundos y se repitió el calentamiento hasta lograr una adecuada homogenización.

**Paso 2:** Se enfrió la mezcla para poder colocar 3  $\mu$ l de Bromuro de etidio (1 $\mu$ l de Bromuro de etidio por cada 30 ml de la mezcla Buffer TAE 1X y agarosa). Se vertió la mezcla en la bandeja para gel y se colocó el peine para moldear los pocillos.

**Paso 3:** Se puso en la cámara de electroforesis la bandeja con el gel ya solidificado, se cubrió con la solución TAE y se retiró el peine.

**Paso 4:** En cada tubo con los productos amplificados se colocó 5  $\mu$ l del buffer de carga, se mezcló y se tomaron 10  $\mu$ l para cargar los pocillos. Se colocó en el pocillo del medio el marcador de peso molecular.

**Paso 5:** Se encendió la cámara de electroforesis durante 45 minutos a un voltaje de 100. Una vez terminado el tiempo se comprobó que las bandas hayan corrido lo suficiente como para ser observadas.

**Paso 6:** Se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se ubicó en el fotodocumentador para visualizar la imagen desde el computador. Se realizó los ajustes necesarios para obtener una imagen adecuada.



**Paso 7:** Se visualizó las bandas de los productos amplificados y se clasificó de acuerdo al tamaño de referencia para el par de oligonucleótidos de *B. dendrobatidis*.

### **3.5 Optimización de la temperatura media de hibridación para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis*.**

El objetivo de este ensayo fue someter a las reacciones a diferentes temperaturas durante la hibridación para conocer si existía alguna afectación en la obtención de amplicones y tener una temperatura media de hibridación acorde a los oligonucleótidos de anfibios.

#### **3.5.1 Preparación de reacciones para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* en muestras de tejido de ranas.**

##### **3.5.1.1 Materiales**

###### **A) Reactivos y soluciones**

- Solución de oligonucleótidos de *Bd*:
  - Forward-1: ITS1-3 *Bd* (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3').
  - Reverse-1: 5.8S *Bd* (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA-3').
  - Forward -2: *Bd*1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3').
  - Reverse -2: *Bd*2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3').
- Solución de dNTP's.
- Enzima platinum *Taq* ADN polimerasa.
- Buffer de PCR 10X.
- Solución de Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$ ) a 50 mM.

###### **B) Equipos y otros materiales**

- Puntas para pipetas de 1 ml, 200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l.
- Micropipetas.
- Tubos Eppendorf 1.5 ml.
- Tubos para PCR de 0.2 ml.
- Congeladores a -20 °C y 4 °C.
- Vórtex.
- Guantes.
- Cabina de PCR.



### 3.5.1.2 Métodos

**Paso 1:** Se preparó las premezclas A y B con los siguientes reactivos:

**Tabla 5:** Reactivos para preparación de la premezcla A y B para la obtención de amplicones de *B. dendrobatidis*.

Reactivos para la pmx A	Cantidad por reacción	Total para 5 reacciones
Agua grado biología molecular	18,25 µl	91,25 µl
Buffer de reacción 10X	2,50 µl	12,5 µl
dNTP's a 10 mM	0,25 µl	1,25 µl
MgCl <sub>2</sub> a 50 mM	1 µl	5 µl
Forward-1: ITS1-3 Bd a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Reverse-1: 5.8S Bd a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Enzima platinum <i>Taq</i> ADN polimerasa	0,20 µl	1 µl
<b>Total</b>	<b>22,6 µl</b>	<b>113 µl</b>
Reactivos para la pmx B	Cantidad por reacción	Total para 5 reacciones
Agua grado biología molecular	18,25 µl	91,25 µl
Buffer de reacción 10X	2,50 µl	12,5 µl
dNTP's 10 mM	0,25 µl	1,25 µl
MgCl <sub>2</sub> a 50 mM	1 µl	5 µl
Forward-2: Bd1a a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Reverse -2: Bd2a a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Enzima platinum <i>Taq</i> ADN polimerasa	0,20 µl	1 µl
<b>Total</b>	<b>22,6 µl</b>	<b>113</b>

### 3.5.2 Procedimiento para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* a diferentes temperaturas a partir de tejidos de ranas.

#### 3.5.2.1 Materiales

##### A) Reactivos y soluciones:

- Premezcla A y B
- ADN total de *G. aff. pseustes* y *A. exiguus*.

##### B) Equipos y otros materiales:

- Termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1)



### 3.5.2.2 Métodos

**Paso 1:** En 5 tubos para PCR colocamos 23 µl de la premezcla A y 23 µl de la premezcla B en 5 tubos más.

**Paso 2:** Se colocó un volumen de 2 µl de ADN total de *A. exiguus* en 5 tubos con la premezcla A y en los restantes de la premezcla B se agregó 2 µl de ADN total de la especie *G. aff. pseustes*.

**Paso 3:** Los 10 tubos fueron colocados en el termociclador con el siguiente perfil de temperaturas.

**Tabla 6:** Perfil de temperatura para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* con diferentes temperaturas de hibridación.

Paso:		Tiempo (min', seg'')	Temperatura (°C)				
Desnaturalización inicial		5' 00''	95 °C				
35 ciclos	Desnaturalización	00' 30''	95 °C				
	Alineamiento	00' 30''	Tubos				
			1A-1B	2A-2B	3A-3B	4A-4B	5A-5B
			48 °C	50,5 °C	55,9 °C	60,8 °C	62 °C
	Extensión	00' 45''	72 °C				
Extensión final		05' 00''	72 °C				
Almacenamiento		∞	4 °C				

**Paso 5:** Se retiró los tubos y se procedió con la visualización de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.

### 3.5.3 Detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio y fotodocumentación de los resultados.

#### 3.5.3.1 Materiales

##### A) Reactivos y soluciones

- Agarosa.
- Buffer TAE [Tris, Acetato, EDTA].
- Bromuro de etidio.



- Buffer de carga [Glicerol, Xilencianol y Azul de Bromofenol].
- Marcador de peso molecular

## **B) Equipos y otros materiales**

- Puntas de pipeta de 200  $\mu$ l y 20  $\mu$ l.
- Micropipetas.
- Cámara de electroforesis.
- Balanza.
- Probetas y recipientes para soluciones
- Espátulas
- Guantes de nitrilo
- Horno microondas
- Fotodocumentador (BioRad Modelo: Gel Doc XR+).

### **3.5.3.2 Métodos**

**Paso 1:** En un matraz Erlenmeyer se colocó 90 ml del buffer TAE. Se pesó 0,9 gr de agar y se mezcló con el buffer TAE para obtener un gel al 1% de agar. La mezcla se colocó en la platina de agitación magnética por unos 2 minutos y luego fue calentada en el horno microondas durante 30 segundos y se repitió el calentamiento hasta lograr una adecuada homogenización.

**Paso 2:** Se enfrió la mezcla para poder colocar 3  $\mu$ l de Bromuro de etidio (1 $\mu$ l de Bromuro de etidio por cada 30 ml de la mezcla buffer TAE 1X y agarosa). Se vertió la mezcla en la bandeja para gel y se colocó el peine para moldear los pocillos.

**Paso 3:** Se puso en la cámara de electroforesis la bandeja con el gel ya solidificado, se cubrió con la solución TAE y se retiró el peine.

**Paso 4:** En cada tubo con los productos amplificados se colocó 5  $\mu$ l del buffer de carga, se mezcló y se sacó 10  $\mu$ l para cargar los pocillos del gel. En el último pocillo se agregó el marcador de peso molecular de 100 bp.

**Paso 5:** Se encendió la cámara de electroforesis durante 45 minutos a un voltaje de 100. Una vez concluido este paso se comprobó que las bandas hayan corrido lo suficiente como para ser observadas.



**Paso 6:** Se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se ubicó en el fotodocumentador para visualizar la imagen desde el computador. Se realizó los ajustes necesarios para obtener una buena calidad de imagen.

**Paso 7:** Se visualizó las bandas de los productos amplificados y se clasificó de acuerdo al tamaño de referencia para el par de oligonucleótidos de *Bd*.

### **3.6 Optimización de la temperatura media de hibridación del ensayo de PCR múltiple para la amplificación del control de proceso y de material genético de *B. dendrobatidis*.**

Para este ensayo se planteó la realización de un PCR múltiple utilizando oligonucleótidos de anfibios que tienen la función de ser el control de proceso y los dos pares de cebadores de *B. dendrobatidis* para la detección de material genético del hongo. Por el tamaño y por no verse afectados por la temperatura de hibridación se decidió trabajar con el cebador ANFFor / ANFRev como el indicador del control de proceso. En este ensayo se aumentó la concentración del gel de agarosa de 1 a 1,5 % para lograr una mejor visualización de los amplicones.

#### **3.6.1 Preparación de las reacciones de amplificación de material genético de anfibios y de *B. dendrobatidis*.**

##### **3.6.1.1 Materiales**

###### **A) Reactivos y soluciones**

- Solución de oligonucleótidos:
  - Forward-1: ANFFor (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3')
  - Reverse- 1: ANFRev (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3').
  - Forward -2: Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3').
  - Reverse -2: Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3').
  - Forward-3: ITS1-3 Bd (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3').
  - Reverse-3: 5.8S Bd (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA-3').
- Solución de dNTP's.
- Enzima platinum **Taq** ADN polimerasa.
- Buffer de PCR 10X.
- Solución de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>).

###### **B) Equipos y otros materiales**

- Puntas para pipetas de 1 ml, 200 µl, 20 µl.
- Micropipetas.



- Tubos eppendorf 1.5 ml.
- Tubos para PCR de 0.2 ml.
- Congeladores a - 20 °C y 4 °C.
- Vórtex.
- Cabina de PCR.
- Centrífuga.

### 3.6.1.2 Métodos

**Paso 1:** Se retiraron los reactivos y muestras de ADN total de los sitios de almacenado (- 20 °C) y se permitió su descongelamiento.

**Paso 2:** Para la premezcla, en un tubo Eppendorf de 1,5 ml se colocó los siguientes reactivos en el orden indicado para un volumen de 23 µl por cada reacción.

**Tabla 7:** Reactivos de la premezcla A y B para amplificación del control de proceso y de material genético de *B. dendrobatidis*.

Reactivos para la pmx A	Cantidad por reacción	Total para 5 reacciones
Agua grado biología molecular	18,25 µl	91,25 µl
Buffer de reacción 10X	2,50 µl	12,5 µl
dNTP's a 10 mM	0,25 µl	1,25 µl
MgCl <sub>2</sub> a 50 mM	1 µl	5 µl
Forward- 1: ANFFor a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Reverse-1: ANFRev a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Forward-2 ITS1-3 Bd a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Reverse-2 5.8S Bd a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Enzima platinum Taq ADN polimerasa	0,20 µl	1 µl
<b>Total</b>	<b>23 µl</b>	<b>115 µl</b>
Reactivos para la pmx B	Cantidad por reacción	Total para 5 reacciones
Agua grado biología molecular	18,25 µl	91,25 µl
Buffer de reacción 10X	2,50 µl	12,5 µl
dNTP's a 10 mM	0,25 µl	1,25 µl
MgCl <sub>2</sub> a 50 mM	1 µl	5 µl
Forward- 1: ANFFor a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Reverse-1: ANFRev a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Forward-2: Bd1a a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Reverse -2: Bd2a a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Enzima platinum Taq ADN polimerasa	0,20 µl	1 µl
<b>Total</b>	<b>23 µl</b>	<b>115 µl</b>



**Paso 3:** Se mezcló la premezcla con ayuda del agitador o vórtex.

### 3.6.2 Procedimiento para la amplificación de material genético de anfibios

#### 3.6.2.1 Materiales

##### A) Reactivos y soluciones:

- Premezcla A
- Premezcla B
- ADN total de *A. exiguus* y *G. aff. pseustes*.

##### B) Equipos y otros materiales:

- Termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1)

#### 3.6.2.2 Métodos

**Paso 1:** Utilizamos 10 tubos para PCR, de los cuales en 5 tubos se agregó 23 µl tubo de la premezcla A y en los restantes 23 µl de la premezcla B.

**Paso 2:** En 5 tubos con la premezcla A se adicionó 2 µl de ADN total de la especie *A. exiguus* y en los otros 5 se añadió 2 µl de ADN total de *G. aff. pseustes*. Así obtuvimos diez reacciones, cada una con un volumen total de 25 µl.

**Paso 3:** Se colocó los 10 tubos en el termociclador y se programó los siguientes ciclos y perfil de temperaturas. Para conocer una temperatura de hibridación adecuada se programó 5 distintas temperaturas:

**Tabla 8:** Perfil de temperaturas para la amplificación del control de proceso y de material genético de *B. dendrobatidis*.

Paso:		Tiempo (min', seg'')	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial		5' 00''	95 °C
35 ciclos	Desnaturalización	00' 30''	95 °C
	Alineamiento	00' 30''	62 °C
	Extensión	00' 45''	72 °C
Extensión final		05' 00''	72 °C
Almacenamiento		∞	4 °C

**Paso 5:** Se retiró los tubos y se procedió con la visualización de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.





### **3.6.3 Procedimiento para la detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio y fotodocumentación de los resultados.**

#### **3.6.3.1 Materiales**

##### **A) Reactivos y soluciones**

- Agarosa.
- Buffer TAE [Tris, Acetato, EDTA].
- Bromuro de etidio.
- Buffer de carga [Glicerol, Xilencianol y Azul de Bromofenol].
- Marcador de peso molecular.

##### **B) Equipos y otros materiales**

- Puntas de pipeta de 200  $\mu$ l y 20  $\mu$ l.
- Micropipetas.
- Cámara de electroforesis.
- Balanza.
- Probetas y recipientes para soluciones
- Espátulas
- Guantes de nitrilo.
- Horno microondas.
- Fotodocumentador (BioRad Modelo: Gel Doc XR+)

#### **3.6.3.2 Métodos**

**Paso 1:** En un matraz Erlenmeyer se colocó 90 ml del buffer TAE. Se pesó 1,35 gr de agar y se mezcló con el buffer TAE para obtener un gel al 1,5 % de agar. La mezcla se colocó en la platina de agitación magnética por unos 2 minutos y luego fue calentada en el horno microondas durante 30 segundos y se repitió el calentamiento hasta lograr una adecuada homogenización.

**Paso 2:** Se enfrió la mezcla para poder colocar 3  $\mu$ l de Bromuro de etidio (1 $\mu$ l de Bromuro de etidio por cada 30 ml de la mezcla Buffer TAE 1X y agarosa). Se vertió la mezcla en la bandeja para gel, se colocó el peine y se esperó a que solidifique.

**Paso 3:** La bandeja con el gel ya solidificado se ubicó en la cámara de electroforesis, se cubrió con la solución TAE 1X y se retiró el peine que forma los pocillos.



**Paso 4:** Se cargaron los pocillos con 10 µl de cada reacción, en las cuales previamente se había agregado 5 µl del buffer de carga. En los 5 primeros pocillos se colocó las reacciones de la premezcla A y en los 5 siguientes los que contenían la premezcla B. En el último pocillo se colocó 6 µl de marcador de peso molecular de 100 bp.

**Paso 5:** Se encendió la cámara de electroforesis durante 45 minutos a un voltaje de 100. Una vez terminado el tiempo se comprobó que las bandas hayan corrido lo suficiente como para ser observadas.

**Paso 6:** Se retiró el gel de la cámara de electroforesis para colocarlo en el fotodocumentador y visualizar la imagen desde el computador. Se realizó los ajustes necesarios para obtener una imagen de buena calidad.

**Paso 7:** Se visualizó las bandas de los productos amplificados y se clasificó de acuerdo al tamaño de referencia para cada par de oligonucleótidos.

### **3.7 PCR múltiple para la detección de material genético de *B. dendrobatidis* de las muestras de hisopados de ranas susceptibles o con signología compatible a quitridiomycosis.**

Para este ensayo se aplicó la temperatura media de hibridación de 62 °C, que fue la mejor obtenida en los ensayos anteriores, además se utilizó como ADN de control o control de proceso al par de cebadores ANFFor/ ANFRev y para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* a los oligonucleótidos Bd1a/Bd2a.

#### **3.7.1 Colecta, conservación, transporte y almacenado de las muestras de hisopados de anfibios susceptibles o con signología clínica compatible con quitridiomycosis.**

Los hisopados fueron obtenidos siguiendo lo propuesto por Brem, Mendelson & Lips e Hyatt y colaboradores (39, 8).

##### **3.7.1.1 Materiales**

###### **A) Biológicos:**

- Anfibios postmetamorfos y adultos.

###### **B) Reactivos y soluciones**

- Etanol al 70% para conservación de la muestra.
- Gel desinfectante para manos.



- Solución de hipoclorito de sodio, formada de 1 parte de cloro comercial y 9 partes de agua.

### **C) Equipos y otros materiales**

- Guantes de látex libres de polvo o guantes de nitrilo.
- Hisopos de rayón de punta fina.
- Cooler o caja para transporte de muestras.
- Esferos y marcadores.
- Tubos de transporte de 10 ml con 2 ml de Etanol al 70%.

#### **3.7.1.2 Métodos**

**Paso 1:** Para la manipulación de las ranas se utilizó un par de guantes por cada individuo y humedecidos con agua limpia. Los especímenes fueron colocados de tal manera que la parte ventral sea de fácil acceso. Se utilizaron dos hisopos por cada rana.

**Paso 2:** La toma de la muestra se realizó sobre el parche de absorción, la parte ventral de los muslos y las plantas de los pies y en cada una de estas partes se pasó el par de hisopos 5 veces con movimiento de barrido.

**Paso 3:** Posteriormente los hisopos se colocaron cuidadosamente dentro de los tubos con etanol al 70 % y transportados en un cooler hasta el LBM-FCA en donde se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

**Paso 4:** Se realizó la correcta disposición de la basura, la asepsia de las manos y la desinfección del calzado.



**Tabla 9:** Especies de ranas muestreadas para el ensayo de PCR múltiple.

<b>Especie</b>	<b>Total de muestras</b>
<i>Atelopus nanay</i>	14
<i>Gastrotheca litonedis</i>	11
<i>Gastrotheca pseustes</i>	8
<i>Atelopus aff. wampucrum</i>	7
<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	7
<i>Pristimantis sp</i>	7
<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	6
<i>Atelopus sp. nov.</i>	4
<i>Espadarana audax</i>	3
<i>Gastrotheca monticola</i>	3
<i>Atelopus balios</i>	2
<i>Atelopus exiguus</i>	2
<i>Epipedobates anthonyi</i>	2
<i>Hyloxalus vertebralis</i>	2
<i>Rhinella horribilis</i>	1
<i>Atelopus bomolochos</i>	1
<i>Hyloscirtus tapichalaca</i>	1
<i>Nymphargus cochramein</i>	1
<i>Rhinella marina</i>	2
<i>Trachycephalus jordani</i>	1
<b>TOTAL</b>	<b>85</b>

### 3.7.2 Procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) del control y de *B. dendrobatidis*.

#### 3.7.2.1 Materiales

##### A) Biológicos

- Hisopados de ranas

##### B) Reactivos

- Solución de lisis [50 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM de EDTA, 700 mM de NaCl, 1 % de CTAB y 0,1 % de  $\beta$ -mercaptoetanol].
- Solución de proteinasa K 20X
- Solución de RNAsa A 100X
- Solución de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico 25:24:1.
- Etanol absoluto.



- Solución de 70 % de Etanol.
- Solución T.E 10:1.

### C) Equipos y otros

- Platina de calentamiento y agitación magnética.
- Potenciómetro.
- Tubos eppendorf 2 ml.
- Microcentrífuga refrigerada.
- Micropipetas de diversos volúmenes.
- Puntas de pipetas 1 ml.
- Equipo de filtración ( $\varnothing$  0.22  $\mu$ m).
- Guantes.
- Vórtex.
- Autoclave.
- Refrigerador (4 °C).
- Congeladores de - 20 °C y - 80 °C.
- Probetas y recipientes para soluciones.

#### 3.7.2.2 Métodos

**Paso 1:** Se retiró las muestras de refrigeración para permitir que alcancen una temperatura ambiente de entre los 23 – 25 °C.

**Paso 2:** Se agitó cada tubo en el vórtex para ayudar al desprendimiento de material biológico del hisopo.

**Paso 3:** Se extrae 1 ml de etanol al 70% del tubo y se coloca en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se adicionó 200  $\mu$ l de la solución de lisis, 4  $\mu$ l de la solución de Proteinasa K y 1  $\mu$ l de RNAsa A, se mezcló en vórtex y luego se incubó durante 1 hora a 60 °C en baño maría.

**Paso 4:** Posteriormente a la incubación se adicionó 200  $\mu$ l de la solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 25:24:1 y se mezcló en vórtex durante 15 segundos.

**Paso 5:** Se centrifugaron las muestras a 12,000 x g durante 10 min a 4°C. Se colectó 180  $\mu$ l de sobrenadante y este fue colocado en un tubo Eppendorf de 1,5 ml nuevo.



**Paso 6:** Se adicionó 2,5 volúmenes, es decir 450 µl de etanol absoluto frío (4 °C), se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente a 12,000 x *g* durante 10 min a 4 °C.

**Paso 7:** Se retiró el sobrenadante mediante decantación y se eliminó la mayor cantidad con ayuda de papel absorbente. Se agregó 400 µl de etanol al 70 %, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 x *g* por 10 min a 4 °C.

**Paso 8:** Se decantó el sobrenadante y se retiró lo más posible con la ayuda del papel absorbente. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y protegida del polvo.

**Paso 9:** La pastilla fue resuspendida en 25 µl de solución de TE 10:1 (pH 8.0) y las muestras de ADN total fueron almacenadas a – 20 °C.

### **3.7.3 Preparación de las reacciones de amplificación de ADN de control y de ADN de *B. dendrobatidis*.**

#### **3.7.3.1 Materiales**

##### **A) Reactivos y soluciones**

- Solución de oligonucleótidos de anfibios.
  - Forward-1: ANFFor (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3').
  - Reverse- 1: ANFRev (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3').
- Solución de cebadores para Bd:
  - Forward -2: Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3').
  - Reverse -2: Bd2a (5'- CATGGTTCATATCTGTCCAG-3').
- Solución de desoxirribonucleótidos trifostato o dNTP's.
- Enzima platinum Taq ADN polimerasa.
- Buffer de PCR 10X.
- Solución de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>).

##### **B) Equipos y otros materiales**

- Puntas para pipetas de 1 ml, 200 µl, 20 µl.
- Micropipetas.
- Tubos eppendorf 1.5 ml.
- Congeladores a - 20 °C y 4 °C.
- Vórtex.
- Cabina de PCR.
- Centrífuga.



### 3.7.3.2 Métodos

**Paso 1:** Se retiraron los reactivos y muestras de ADN total de los sitios de almacenamiento (- 20 °C) y se permitió su descongelamiento.

**Paso 2:** En un tubo Eppendorf de 1,5 ml se colocó los siguientes reactivos en el orden indicado para un volumen de 23 µl por cada reacción. Se estimó el volumen de premezcla necesaria según el número de muestras analizadas.

**Tabla 10:** Reactivos de la premezcla para la fase de amplificación en el ensayo de PCR múltiple.

Reactivos	Cantidad por reacción	Total para 5 reacciones
Agua grado biología molecular	18,25 µl	91,25 µl
Buffer de reacción 10X	2,50 µl	12,5 µl
dNTP's a 10 mM	0,25 µl	1,25 µl
MgCl <sub>2</sub> a 50 mM	1 µl	5 µl
Forward- 1: ANFFor a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Reverse-1: ANFRev a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Forward-2: Bd1a a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Reverse -2: Bd2a a 100 µM	0,20 µl	1 µl
Enzima platinum Taq ADN polimerasa	0,20 µl	1 µl
<b>Total</b>	<b>23 µl</b>	<b>115 µl</b>

**Paso 3:** Se mezcló la premezcla con ayuda del agitador o vórtex.

### 3.7.4 Procedimiento para la amplificación de ADN de control y material genético de *B. dendrobatidis*.

#### 3.7.4.1 Materiales

##### A) Biológicos:

- ADN total de las 85 muestras.

##### B) Reactivos y soluciones:

- Premezcla.
- Agua grado biología molecular

##### C) Equipos y otros materiales:

- Termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1).
- Guantes
- Puntas para pipetas de 1 ml, 200 µl, 20 µl.



- Micropipetas.
- Tubos para PCR de 0.2 ml.

### 3.7.4.2 Métodos

**Paso 1:** En tubos para PCR agregamos 23  $\mu$ l de la premezcla y adicionamos 2  $\mu$ l de ADN total extraído. Para el control negativo del ensayo adicionamos en un tubo para PCR 25  $\mu$ l de agua grado biología molecular.

**Paso 2:** Identificamos cada tubo según la muestra a la que corresponda.

**Paso 3:** Se colocó cada tubo dentro del termociclador y se programó los siguientes ciclos y perfil de temperaturas.

**Tabla 11:** Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético en el ensayo de PCR múltiple.

<b>Paso:</b>		<b>Tiempo (min', seg'')</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Desnaturalización inicial		5' 00''	95 °C
35 ciclos	Desnaturalización	00' 30''	95 °C
	Alineamiento	00' 30''	62 °C
	Extensión	00' 45''	72 °C
Extensión final		05' 00''	72 °C
Almacenamiento		$\infty$	4 °C

**Paso 5:** Se retiró los tubos y se procedió con la visualización de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.

### 3.7.5 Procedimiento para la detección de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio y fotodocumentación de los resultados.

#### 3.7.5.1 Materiales

##### A) Reactivos y soluciones

- Agarosa.
- Buffer TAE [Tris, Acetato, EDTA].
- Bromuro de etidio.
- Buffer de carga [Glicerol, Xilencianol y Azul de bromofenol].
- Marcador de peso molecular





## B) Equipos y otros materiales

- Puntas de pipeta de 200  $\mu$ l y 20  $\mu$ l.
- Micropipetas.
- Cámara de electroforesis.
- Balanza.
- Probetas y recipientes para soluciones
- Espátulas
- Guantes de nitrilo
- Horno microondas
- Fotodocumentador (BioRad Modelo: Gel Doc XR+).

### 3.7.5.2 Métodos

**Paso 1:** En un matraz Erlenmeyer se colocó 90 ml o 30 ml del buffer TAE, según el tamaño del gel que se necesitó. Se pesó 1,35 gr o 0,45 gr de agar y se mezcló con el buffer TAE para obtener un gel al 1,5 % de agar. La mezcla se colocó en la platina de agitación magnética por unos 2 minutos y luego fue calentada en el horno microondas durante 30 segundos y se repitió el calentamiento hasta lograr una adecuada homogenización.

**Paso 2:** Se enfrió la mezcla para colocar 3 o 1  $\mu$ l de Bromuro de etidio según el volumen de mezcla preparada (1 $\mu$ l de Bromuro de etidio por cada 30 ml de la mezcla Buffer TAE 1X y agarosa). Se vertió la mezcla en la bandeja para gel, se colocaron dos peines y se esperó a que solidifique.

**Paso 3:** La bandeja con el gel solidificado fue colocada en la cámara de electroforesis, se cubrió con la solución TAE y se retiraron los peines que forman los pocillos.

**Paso 4:** En cada tubo con los productos amplificados se adicionó 5  $\mu$ l del buffer de carga, incluido el control negativo, se mezcló y se tomó 10  $\mu$ l para cargar cada pocillo. El último pocillo se cargó con 6  $\mu$ l de marcador de peso molecular de 100 bp.

**Paso 5:** Se encendió la cámara de electroforesis durante 45 minutos a un voltaje de 100 V o a 80 V durante 1 hora aproximadamente. Concluido este paso se comprobó que las bandas hayan corrido lo suficiente como para ser observadas.



**Paso 6:** Se retiró el gel de la cámara de electroforesis y se ubicó en el fotodocumentador para visualizar la imagen desde el computador. Se ajustaron las imágenes para obtener las mejores imágenes.

**Paso 7:** Se visualizó las bandas de productos amplificados y se las clasificó de acuerdo al tamaño de referencia para cada par de oligonucleótidos.

### **3.8 Repetición del ensayo de PCR múltiple en muestras que no amplificaron el control de proceso.**

Con el fin de descartar problemas durante la amplificación con el set ANFFor/ ANFRev anteriormente usado se realizó una repetición del ensayo de PCR múltiple empleando el otro par de oligonucleótidos para anfibios Chmf4/ Chmr4 con tamaño de 658 pares de bases. Se siguió los mismos procedimientos mencionados en el ensayo 5, con un cambio en la temperatura de hibridación de 62 °C a 48 °C, la cual es la recomendada para este set.

Segundo set de oligonucleótidos para anfibios:

- Forward-1: Chmf4 (5'-TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATCGG-3').
- Reverse-1: Chmr4 (5'-ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA-3').

### **3.9 Optimización del ensayo de PCR en tiempo real para la detección de material genético de *B. dendrobatidis*.**

Este ensayo se realizó como preliminar al diagnóstico de *Bd* en las muestras y así conocer la validez de reactivos. Se siguió lo indicado por la OIE con algunas modificaciones para la realización de esta prueba, por lo tanto de trabajó según los tiempos propuestos en su manual. Para este ensayo se utilizó material genético clonado de *B. dendrobatidis*, el cual fue insertado en plásmidos de *Escherichia coli*.

#### **3.9.1 Preparación de reacciones para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* mediante qPCR.**

##### **3.9.1.1 Materiales**

###### **A) Biológicos**

- Plásmido de *Escherichia coli* con material genético de *B. dendrobatidis*.

###### **B) Reactivos y soluciones**

- Solución de oligonucleótidos de *Bd*:
  - Forward-1: ITS1-3Bd (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3').



○ Reverse-1: 5.8SBd (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAA-3'). (8)

- Solución de dNTP's
- Enzima platinum *Taq* ADN polimerasa
- Buffer de PCR 10X.
- Solución de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) a 50 m.
- Sonda Chytr MGB2, marcada con FAM: 5'-6FAM-CGA-GTC-GAA-CAA-AAT-MGBNFQ-3'

### C) Equipos y otros materiales

- Puntas para pipetas de 1 ml, 200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l.
- Micropipetas.
- Tubos eppendorf 1.5 ml.
- Vórtex.
- Guantes.
- Cabina de PCR.

### 3.9.1.2 Métodos

**Paso 1:** Se realizó una premezcla con los siguientes reactivos

**Tabla 12:** Reactivos para la preparación de la premezcla la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis*.

Reactivos para la pmx	Cantidad por reacción	Total para 5 reacciones
Agua grado biología molecular	19,20 $\mu$ l	96 $\mu$ l
Buffer de reacción 10X	2,50 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l
dNTP's a 10 mM	0,50 $\mu$ l	2, 5 $\mu$ l
$MgCl_2$ a 50 mM	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Forward - 1: ITS1-3 Bd a 900 nM	0,20 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Reverse - 1: 5.8S Bd a 900 nM	0,20 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Enzima platinum <i>Taq</i> ADN polimerasa	0,20 $\mu$ l	1 $\mu$ l
SONDA Chyt 250 nM	0,20 $\mu$ l	1 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>24 <math>\mu</math>l</b>	<b>120<math>\mu</math>l</b>



### 3.9.2 Procedimiento para la amplificación de material genético *B. dendrobatidis* mediante qPCR

#### 3.9.2.1 Materiales

##### A) Reactivos y soluciones:

- Premezcla.
- Solución de plásmido con material genético de *Bd*.

##### B) Equipos y otros materiales:

- Termociclador (IANLONG TL988)
- Cabina de PCR
- Tubos para qPCR de 0,1 ml
- Guantes
- Micropipetas.

#### 3.9.2.2 Métodos

**Paso 1:** En 4 microtubos para PCR colocamos 20 µl de la premezcla en cada uno.

**Paso 2:** Se colocó un volumen de 5 µl de la solución de plásmido con *Bd* en cada tubo y otro con 25 µl agua grado biología molecular para control negativo.

**Paso 3:** Los 6 tubos fueron colocados en el termociclador con el siguiente perfil de temperatura

**Tabla 13:** Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* mediante qPCR.

Paso:		Tiempo (min', seg'')	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial		2' 00''	50 °C
Desnaturalización		10' 00''	95 °C
45 ciclos	Alineamiento	00' 15''	95 °C
	Extensión	1' 00''	60 °C
Almacenamiento		∞	4 °C

**Paso 4:** Se procedió con la visualización de los productos en tiempo real amplificados mediante el software.



### 3.10 PCR en tiempo real para la detección de material genético de *B. dendrobatidis* de las muestras de hisopados de ranas susceptibles o con signología compatible a quitridiomycosis

#### 3.10.1 Preparación de reacciones para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* a partir de hisopados de piel de ranas mediante qPCR.

##### 3.10.1.1 Materiales

###### A) Biológicos

- Plásmido de *Escherichia coli* con material genético de *Bd*.

###### B) Reactivos y soluciones

- Solución de oligonucleótidos de *Bd*:
  - Forward-1: ITS1-3 *Bd* (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3').
  - Reverse-1: 5.8S *Bd* (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA-3'). **(8)**
- Solución de dNTP's
- Enzima platinum **Taq** ADN polimerasa
- Buffer de PCR 10X.
- Solución de Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) a 50 mM.
- Sonda Chytr MGB2, marcada con FAM: 5'-6FAM-CGA-GTC-GAA-CAA-AAT-MGBNFQ-3'

###### C) Equipos y otros materiales

- Puntas para pipetas de 1 ml, 200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l.
- Micropipetas.
- Tubos eppendorf 1.5 ml.
- Tubos para PCR de 0.1 ml.
- Vórtex.
- Guantes.
- Cabina de PCR.

##### 3.10.1.2 Métodos

**Paso 1:** Se realizó una premezcla



**Tabla 14:** Reactivos para la preparación de la premezcla la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis*.

Reactivos para la pmx A	Cantidad por reacción	Total para 5 reacciones
Agua grado biología molecular	19,20 $\mu$ l	96 $\mu$ l
Buffer de reacción 10X	2,50 $\mu$ l	12,5 $\mu$ l
dNTP's a 10 mM	0,50 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> a 50 Mm	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Forward - 1: ITS1-3 Bd a 900 nM	0,20 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Reverse - 1: 5.8S Bd a 900 nM	0,20 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Enzima platinum Taq ADN polimerasa	0,20 $\mu$ l	1 $\mu$ l
SONDA Chyt 250 nM	0,20 $\mu$ l	1 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>24 <math>\mu</math>l</b>	<b>120 <math>\mu</math>l</b>

### 3.10.2 Procedimiento para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* a partir de hisopados de piel de ranas mediante qPCR.

En este ensayo se utilizó el material genético de las 85 muestras que en ensayos anteriores se habían procesado, extraído el ADN y guardado a -20°C.

#### 3.10.2.1 Materiales

##### A) Reactivos y soluciones:

- Premezcla
- ADN total de ranas.

##### B) Equipos y otros materiales:

- Termociclador (IANLONG TL988)
- Cabina de PCR
- Tubos para qPCR de 0,1 ml

#### 3.10.2.2 Métodos

**Paso 1:** Se retiró las muestras de refrigeración para que alcancen una temperatura ambiente de entre los 23 – 25 °C, las cuales estaban resuspendidas en 25  $\mu$ l de solución de TE 10:1.

**Paso 2:** En los tubos para PCR de 0,1 ml colocamos 5  $\mu$ l de la premezcla.



**Paso 3:** Se colocó un volumen de 5 µl de ADN total de cada muestra para su amplificación. En un microtubo adicional se colocó 5 µl de la solución de plásmido con *Bd* para control positivo y otro con 25 µl agua grado biología molecular para control negativo.

**Paso 4:** Los tubos fueron colocados en el termociclador con el siguiente perfil de temperatura.

**Tabla 15:** Perfil de temperaturas para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* mediante qPCR.

Paso:		Tiempo (min', seg''):	Temperatura (°C)
Desnaturalización inicial		2' 00''	50 °C
Desnaturalización		10' 00''	95 °C
45 ciclos	Alineamiento	00' 15''	95 °C
	Extensión	1' 00''	60 °C
Almacenamiento		∞	4 °C

**Paso 5:** se procedió con la visualización de los productos en tiempo real amplificados.

### 3.11 Análisis estadístico.

En este estudio se determinó la frecuencia absoluta y relativa de los resultados positivos, negativos y no válidos del ensayo de PCR convencional múltiple en 86 muestras de hisopado de piel de ranas.

Se evaluó la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo de PCR convencional múltiple contrarrestando los resultados entre los obtenidos bajo PCR en tiempo real. Para este objetivo se utilizó un cuadro de contingencia de 2x2 y se aplicó las siguientes fórmulas.

$$\text{Sensibilidad } Dx = \frac{VP}{VP+FN}$$

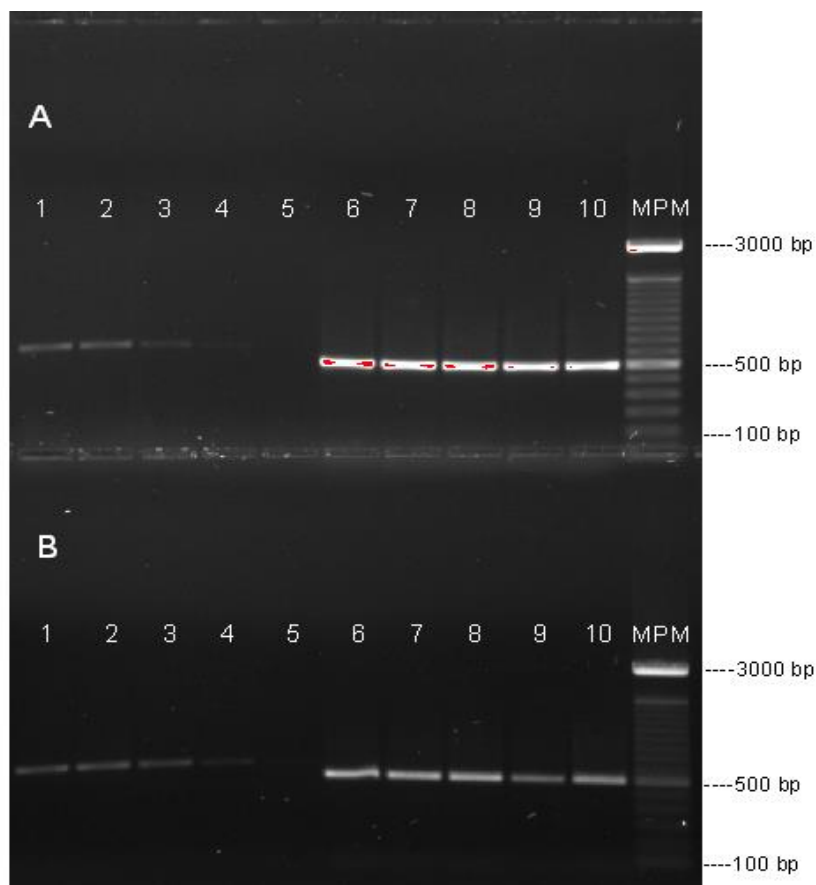
$$\text{Especificidad } Dx = \frac{VN}{VN+FP}$$

Según los resultados obtenidos en qPCR se obtuvo la frecuencia de positivos y negativos y la prevalencia de la enfermedad en los animales muestreados y en las localidades estudiadas.

## CAPITULO IV: RESULTADOS

### 4.1 Obtención del control de proceso válido.

Luego de la fotodocumentación del gel de agarosa se observó en las muestras de las dos especies de ranas (*A. exiguus* y *G. aff. Pseustes*) productos amplificados correspondientes a los dos pares de oligonucleótidos de anfibios utilizados. Sin embargo, los oligonucleótidos de ChmF4/ChmR4 no se amplificaron apropiadamente, ya que se vieron afectados por una temperatura de hibridación. Por el contrario, los primers de ANFFor / ANFRev indicaron una correcta y clara amplificación en las diferentes temperaturas aplicadas, mostrando unas bandas de aproximadamente 590 bp, por lo tanto este par de oligos se utilizó en ensayos posteriores de PCR múltiple para ajustar su temperatura de hibridación a la de los cebadores de *B. dendrobatidis*.

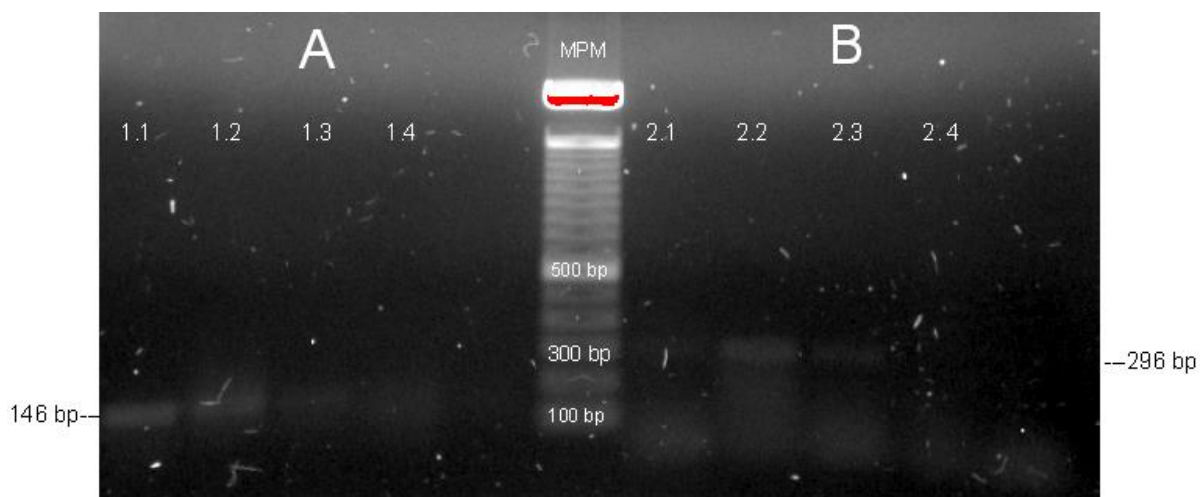


**Figura 2:** Productos amplificados del control de proceso bajo PCR convencional. En la imagen **A** correspondiente a *A. exiguus*, los carriles **1-5**, muestran amplicones de ChmF4/ChmR4 con  $\pm 658$  bp y los carriles **6-10** amplicones de ANF for/ANF Rev de  $\pm 590$  bp; en la imagen **B**, de *G. aff. pseustes*, en las muestras de **1-5**, hay amplicones de ChmF4/ChmR4 con  $\pm 658$  bp y en las muestras **6-10** amplicones de ANF for/ANF Rev de  $\pm 590$  bp, MPM: Marcador de peso molecular



#### 4.2 Detección de material genético de *B. dendrobatidis*.

Las muestras de *A. exiguus* al igual que las de la especie *G. aff. pseustes* resultaron positivas a la presencia de material genético de *Bd*, estos individuos murieron con signología compatible a quitridiomycosis. En la premezcla A, sometida a una temperatura de hibridación de 60°C se amplificó ADN del hongo en las 4 muestras, mientras que con la premezcla B, con otro par de oligonucleótidos y a temperatura de hibridación de 50 °C, en la muestra 2,4 de *G. aff. pseustes* no se identificó el amplicon del hongo. Sin embargo, este ensayo permitió tener una referencia de la presencia del material genético del patógeno en las muestras y por lo tanto pudieron ser usadas en los siguientes ensayos.

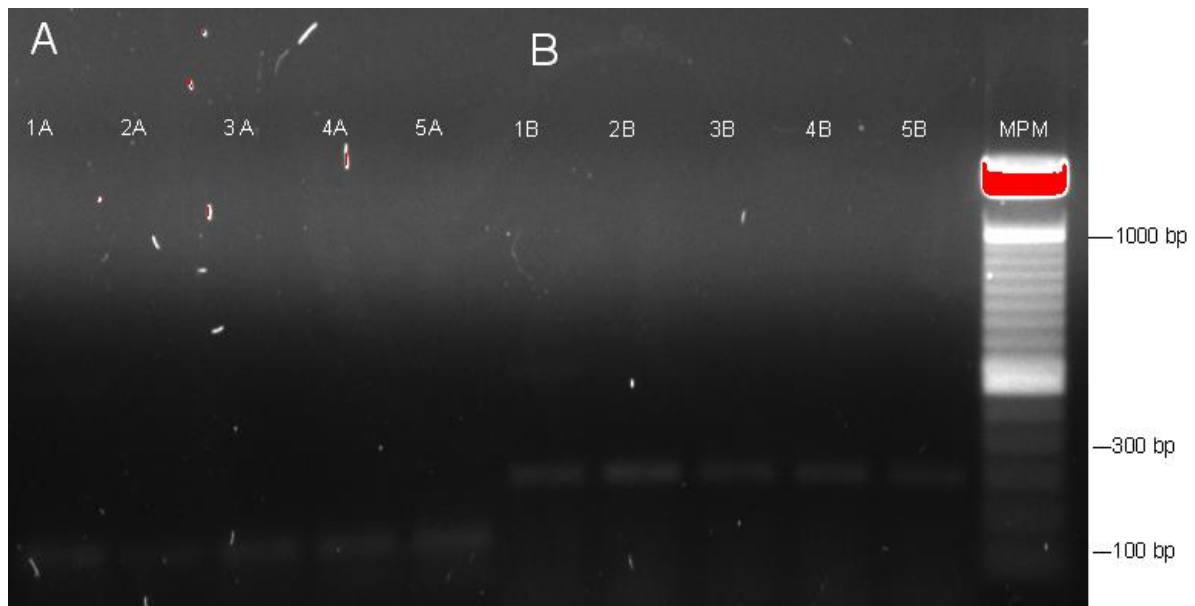


**Figura 3:** Material genético de *B. dendrobatidis* amplificado. En la sección **A**, amplicones del par de cebadores **ITS 1-3Bd/5.8SBd** de **146 bp** en las muestras 1.1 y 1.2 pertenecientes a *A. exiguus* y en muestras 1.3 y 1.4 de *G. aff. pseustes*. En el segmento **B**, productos amplificados de los cebadores **Bd1a/Bd2a** de **296 bp** en las muestras 2.1 y 2.2 de *A. exiguus* y en la muestra 2.3 de *G. aff. pseustes*. En el carril **2.4** no se observó con claridad un amplicon; MPM: marcador de peso molecular.

#### 4.3 Optimización de la temperatura de hibridación para la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis*.

En este ensayo se logró la amplificación de los dos pares de oligonucleótidos de *Bd* a diferentes temperaturas a partir de muestras de dos especies *A. exiguus* y de *G. aff. pseustes*. El par ITS1-3Bd/5.8SBd a temperatura de 48 °C y 50.5 °C (carriles 1 y 2, A y B) se ve afectado durante la hibridación puesto que las bandas de amplificación no son muy claras. El cebador Bd1a/Bd2a sufrió una mínima afectación en las diferentes temperaturas. Sin embargo, la temperatura de 62 °C la cual fue aplicada a los tubos 5A y 5B fue la elegida para los siguientes ensayos ya que esta

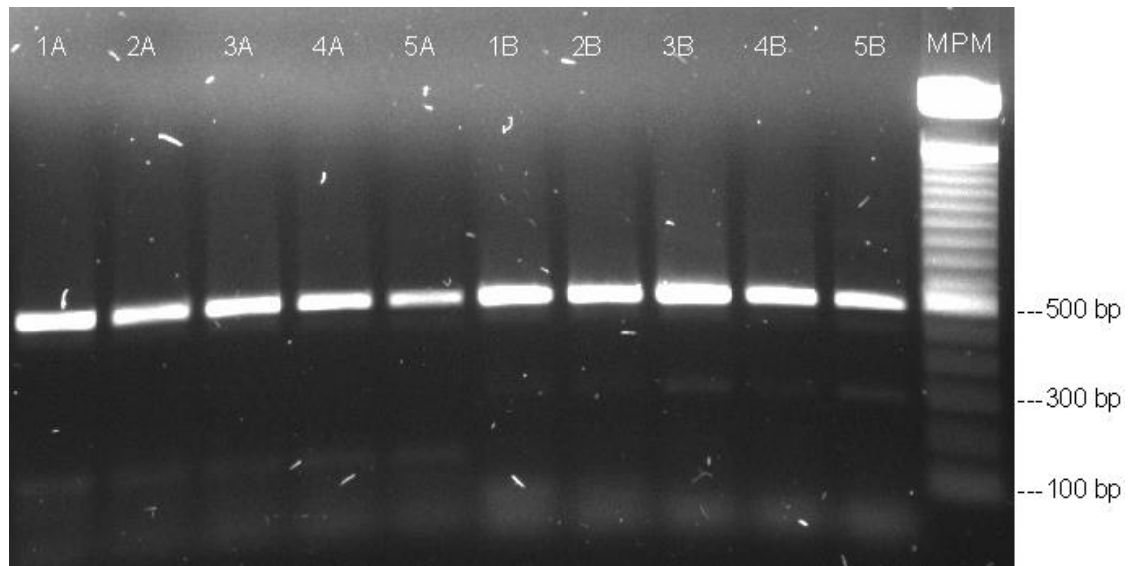
es la más parecida a la temperatura media de hibridación del par de cebadores para anfibios, ANFFor/ ANFRev, que está entre los 60 °C.



**Figura 4:** Amplificación de cebadores de *B.dendrobatidis*. En **A**, muestras de *A. exiguus*, amplificando productos de *B. dendrobatidis* con el par de primers ITS1-3Bd/5.8SBd de 146 bp y en **B**, muestras de *G. aff. pseustes* con amplicones de Bd1a/Bd2a de 296 bp.

#### 4.4 Optimización de la temperatura media de hibridación del ensayo de PCR múltiple para la amplificación del control de proceso y detección de material genético de *Bd*.

El aumento en la concentración de agar del 1 al 1,5 % permitió evidenciar de forma más clara los productos amplificados. El control de proceso correspondiente al par de cebadores AFNFor/ ANFRev de 590 pares de bases se amplificó correctamente en todas las muestras de las dos especies de anfibios. Adicionalmente, el material genético de *Bd* se amplificó con ambos pares de oligonucleótidos. Los dos tipos de amplicones fueron obtenidos bajo una temperatura media de hibridación de 62 °C y no existió interferencia entre cebadores diferentes que pudiese alterar la amplificación.



**Figura 5:** Productos de amplificación de la PCR múltiple durante la optimización de la temperatura media de hibridación. Se observa el control de proceso con **590 bp** y la amplificación de material genético de *B. dendrobatidis* con los dos tipos de oligonucleótidos; de 1A- 5A cebadores **ITS1-3Bd/5.8SBd** de **146 bp** en muestras de **A. exiguus**; 1B-5B cebadores **Bd1a/Bd2a** de **296 bp** en muestras de **G. aff. pseustes**; MPM: marcador de peso molecular.

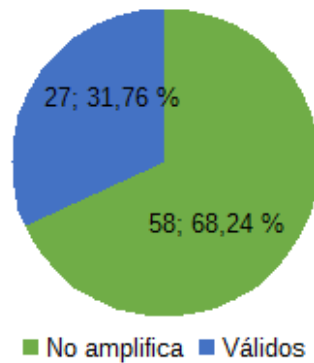
#### 4.5 PCR múltiple para la detección de material genético de *B. dendrobatidis* en muestras de hisopados de ranas susceptibles o con signología compatible a quitridiomycosis.

Los resultados válidos al ensayo de PCR múltiple desarrollado en el LBM-FCA, fueron todos aquellos en los que se amplificó el control de proceso. De las 85 muestras, el 2,35 % resultaron positivas a *Bd* y el 27,91 % fueron negativas. El 67,44 %, es decir 58 muestras no mostraron amplificaciones (**Anexo 2**). En ninguno de los ensayos se observó amplificaciones del control negativo. De las ocho familias de ranas muestreadas, en una no se obtuvo la amplificación de ADN de anfibios que funcionó como control de proceso.

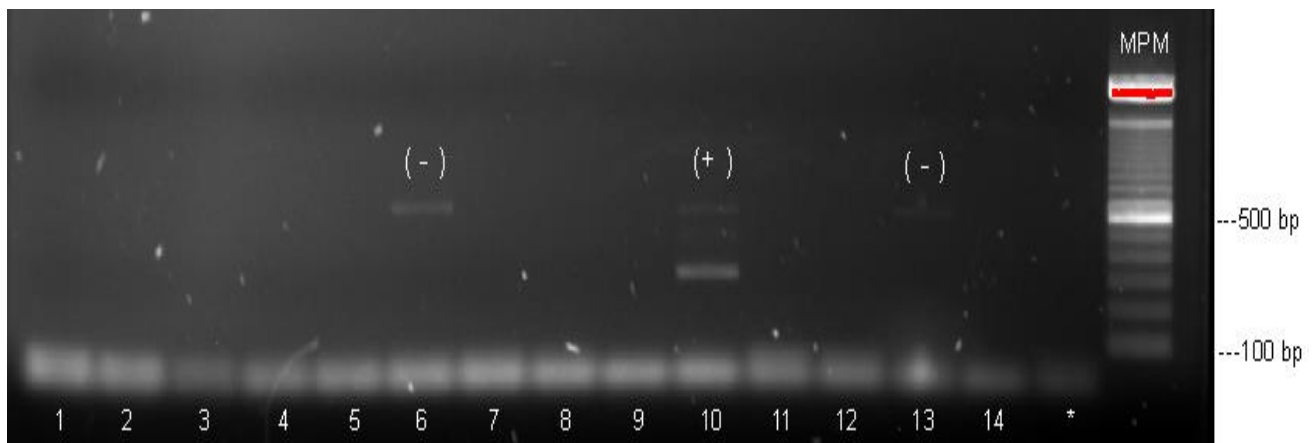
**Tabla 16:** Familias de ranas en las se amplificó el control del proceso

Familia	# muestras	# amplificaciones
Bufonidae	33	6
Centrolenidae	10	7
Craugastoridae	7	1
Dendrobatidae	4	1
Hemiphractidae	22	10
Microhylidae	7	2
Hylidae	2	0
<b>Total</b>	<b>85</b>	<b>27</b>

### Amplificación del control de proceso



**Figura 6.** Porcentajes de amplificación del control de proceso.



**Figura 7:** Resultados de un ensayo de PCR múltiple convencional. Se observan dos muestras consideradas negativas a *Bd* (-) en carriles 6 y 13 ya que solo se amplificó el control de proceso, y una positiva (+) en el carril 10, mostrando la amplificación del control de proceso de **560 bp** y de *B. dendrobatidis* de **296 bp**.

**Tabla 17:** Resultados del ensayo de PCR convencional múltiple

Resultados	Positivos (+)		Negativos (-)		No válidos	
	N°	%	N°	%	N°	%
<b>PCR convencional múltiple</b>	2	2,35	25	29,41	58	68,24



#### 4.6 Repetición del ensayo de PCR múltiple en muestras que no amplificaron el control de proceso.

De las 58 muestras repetidas solo en una (CCA-018) se amplificó el control de proceso con el nuevo set de cebadores y en una muestra adicional que se conocía como positiva se amplificó el ADN de control y del hongo quítrido.

#### 4.7 Resultados de la optimización del ensayo de PCR en tiempo real para la detección de material genético de *B. dendrobatidis*.

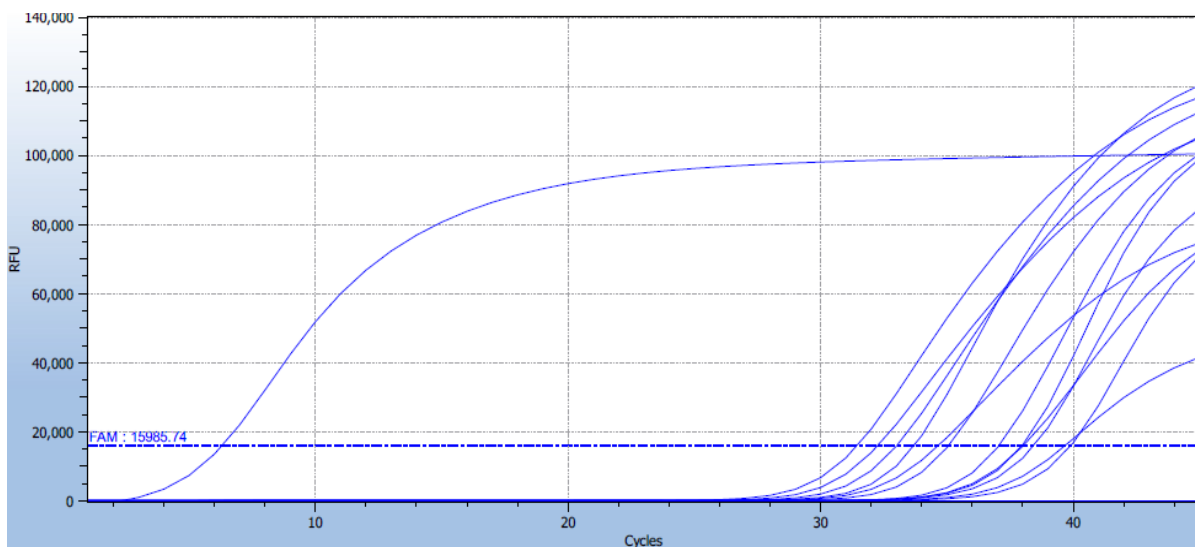
En este ensayo las 4 muestras resultaron positivas a *Bd*, así mismo el control positivo se amplificó y el control negativo resultó negativo.

#### 4.8 Resultados del análisis de las muestras de hisopado con PCR en tiempo real.

El ensayo de qPCR se realizó en 27 muestras consideradas como válidas en la PCR convencional múltiple, y de esas el 25,93 % resultaron positivas (**Anexo 3**).

**Tabla 18:** Resultados de la qPCR realizada en muestras de hisopados de ranas.

	Positivos	Negativos
PCR en tiempo real	7	20



**Figura 8.** Amplificaciones de muestras de la PCR en tiempo real.



#### 4.9 Cálculo de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo de PCR convencional múltiple.

**Tabla 19:** Cuadro de contingencia de 2x2 basado en los resultados obtenidos en PCR convencional múltiple y PCR en tiempo real (**Anexo 4**).

PCR convencional múltiple	PCR en tiempo real				Total
	Positivos (+)		Negativos (-)		
Positivos (+)	VP	1	FP	1	2
Negativos (-)	FN	6	VN	19	25

#### Sensibilidad

$$\frac{1}{1 + 6} = \frac{1}{7} \times 100 = 14,29\%$$

#### Especificidad

$$\frac{19}{19 + 1} = \frac{19}{20} \times 100 = 95\%$$

#### 4.10 Cálculo de la prevalencia de la enfermedad

El cálculo de la prevalencia se realizó según los resultados de la PCR en tiempo real llevada a cabo en 27 muestras válida, de las cuales 7 resultaron positivas, siendo la prevalencia de la quitridiomycosis del 25,93 %.

**Tabla 20:** Prevalencia de la quitridiomycosis según las localidades estudiadas.

Localidad	Muestras válidas	Positivos a <i>Bd</i>	Prevalencia
Altar Urco	2	2	100 %
Cerro Negro	0	0	0
Monay- Baguanchi	3	1	33,33 %
CCA- Amaru	21	4	19,05%
Challuabamba	1	0	0



## CAPITULO V: DISCUSIÓN

En el año 2004 Boyle et. al e Hyatt y colaboradores en el 2007 realizaron sus respectivos trabajos para la detección de *B. dendrobatidis* mediante PCR-TaqMan en tiempo real **(7,8)**. Actualmente, la OIE establece a estas pruebas como una referencia para el diagnóstico del hongo quítrido en anfibios. Este ensayo cuenta con un control interno el cual permite detectar inhibidores durante el proceso de amplificación **(19)**, siendo así un indicativo de que la generación de amplicones es correcta. Nuestro ensayo de PCR convencional múltiple, posee un control de proceso el cual está basado en material genético de anfibios, permitiéndonos saber si los pasos previos a la amplificación, tales como la obtención de la muestra a partir del hospedero y el proceso de extracción de ADN fueron correctos. En este trabajo, el 68,24 % de muestras que no generaron amplicones de anfibios, fueron consideradas como no válidas, pues al no amplificarse el control de proceso quedó demostrado que no hay material genético susceptible de amplificación. La ausencia de amplificación podría atribuirse a que el contacto del hisopo con la rana es insuficiente o que existe una falta de experiencia por parte del personal que toma la muestra, hechos que conllevan a un escaso desprendimiento de células de anfibios, en especial en individuos con infecciones subclínicas. La sensibilidad del 14,29 % del ensayo de PCR convencional múltiple, más los resultados de las muestras consideradas como negativas en el ensayo de PCR convencional múltiple y que fueron positivas a *Bd* ante la PCR de tiempo real, demuestran una vez más la alta sensibilidad del ensayo de la qPCR y que la cantidad de ADN del patógeno estuvo por debajo de los nivel de detección en el ensayo de PCR convencional, lo que coincide con el estudio de Hyatt et. al **(8)**, donde también se menciona que los resultados falsos negativos con respecto a la presencia de material genético de *Bd* se debe a que el muestreo coincide con etapas iniciales de la infección en la que hay menor cantidad de zoosporas y/o por la presencia de inhibidores en la muestra tales como detritus o tierra. Así mismo, un estudio refleja que la técnica de hisopado frecuentemente arroja falsos negativos en el diagnóstico de *Bd* cuando la carga del hongo en el hospedador es baja **(54)**.

Entonces durante estudios para conocer la presencia de *B. dendrobatidis* y ante casos negativos, se propone que para considerarlos realmente negativos a la infección o a la presencia de *B. dendrobatidis* se debería realizar por lo mínimo 3 muestreos con un intervalo de 14 días cada uno como lo sugiere Hyatt, et. al **(8)**. De manera similar los animales que resultan positivos y que reciben tratamientos antimicóticos deberían ser reevaluados para saber si están libres de *B. dendrobatidis* y con ello realizar los baños necesarios, sin olvidar los protocolos de bioseguridad para evitar la diseminación del hongo quítrido **(41)**.



Trabajos realizados en otras especies para la detección patógenos utilizan un control interno basado en ADN del hospedero **(42,43)** y con ello disminuir el número de falsos negativos. En 7 de las 8 familias se amplificó el control de proceso, lo que nos indica que estos primers universales podrían seguir siendo utilizados para amplificar material genético de anfibios en futuros ensayos.





## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

Con la implementación del ensayo de PCR convencional múltiple se logró la amplificación de material genético del hongo patógeno *B. dendrobatidis* y de ADN de anfibios, el cual se utilizó como control de proceso. De un total de 85 muestras analizadas bajo el ensayo de PCR múltiple convencional se obtuvo un 29,41 % de negativos, un 2,35 % de positivos y el 68,24 % fueron consideradas muestras no válidas. Con el análisis en PCR en tiempo real de 27 muestras validas en la PCR convencional múltiple, se obtuvo un 25,93 % positivos y un 74,07 % negativos. Comparando con los resultados obtenidos, se concluye que este ensayo de PCR convencional múltiple, es el 95% específico y 14,29 % sensible, lo que indica que todos los positivos no son detectados adecuadamente pero sí los negativos.

Con la amplificación del control de proceso (ANFFor/ ANFRev) en los primeros ensayos, en un 31,76 % de muestras analizadas y en 6 de 7 familias de ranas estudiadas, se establece que los procesos de extracción de ADN funcionaron correctamente.

El ensayo que determinó la temperatura media de hibridación de 62 °C para cebadores de *B.dendrobatidis*, nos indica que cualquiera de los dos tipos de oligonucleótidos (el par ITS1-3Bd/5.8SBd o Bd1a/Bd2a), pueden ser utilizados en futuros ensayos conjuntamente con los oligonucleótidos de anfibios. En este estudio para facilitar la visualización de las bandas por el tamaño se prefirió usar Bd1a/Bd2a de 296 pares de bases.

La repetición del ensayo con el otro par de oligonucleótidos de anfibios exclusivamente con las muestras que no amplificaron nada, es indicativo de que la ausencia de amplicones se debe probablemente a errores durante la toma de muestras que no permitió obtener una cantidad suficiente de material genético tanto de anfibios como del hongo patógeno.

La ausencia de un porcentaje de prevalencia en la localidad de Cerro Negro se debe a que no hubo muestras válidas para ser analizadas bajo qPCR. La prevalencia más alta se encuentra en Altar Urco, con un 100%, ya que las dos únicas muestras validas resultaron positivas, seguido de la localidad de Monay-Baguanchi con un 33,33 % de positivos. Sin embargo con un mayor porcentaje de muestreo, la localidad del centro de Conservación de anfibios Amaru, resultó con un 19,05% y la localidad de Challuabamba un 0%, ya que la única muestra válida resultó ser negativa al hongo en qPCR. De manera general, en las muestras válidas analizadas se detectó *B. dendrobatidis* en un 25,93 %.



## CAPITULO VII: RECOMENDACIONES

- Durante el proceso de extracción se debe tener cuidado al momento de decantar el sobrenadante del etanol al 70% como último paso para obtener la pastilla de ADN, la cual gracias a la centrifugación se pega en el fondo del tubo, pero revoluciones insuficientes podrían hacer que no se pegue adecuadamente, ya que en unas muestras se notó que no se quedaba pegado al mismo y era fácil que se elimine durante el vaciado del etanol.
- Clonar el material genético de *B. dendrobatidis* de las muestras positivas para realizar soluciones seriadas y realizar ensayos que permitan encontrar los niveles mínimos de detección de *B. dendrobatidis* de nuestro ensayo de PCR convencional múltiple.
- Repetir el ensayo con hisopos de algodón estériles, ya que conseguir los hisopos de rayón en el país es difícil y son costosos en el extranjero.
- Realizar estudios de prevalencia y con más número de muestras en las localidades que resultaron positivas a *B. dendrobatidis* y hacer la revisión de los animales mantenidos en cautiverio en el CCA Amaru que también resultaron positivos.



## CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Young BE, Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Boucher TM. Joyas que están desapareciendo: El Estado de los Anfibios del Nuevo Mundo [Internet]. Virginia: Nature Serve; 2004. Disponible desde: <http://docplayer.es/316568-Joyas-que-estan-desapareciendo-el-estado-de-los-anfibios-en-el-nuevo-mundo.html>
2. Ron S, Yanez-Muñoz MH, Merino-Viteri M, Ortiz DM. Anfibios del Ecuador. Version 2018.0 [Internet]. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 2018 [citado 3 de Abr 2018]. Disponible desde: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/>
3. Proaño-Bolaños C, Zhou M, Wang L, Coloma LA, Chen T, Shaw C. Peptidomic approach identifies cruzioseptins, a new family of potent antimicrobial peptides in the splendid leaf frog, *Cruziohyala calcarifer*. J Proteomics [Internet]. 2016;146:1–13. Disponible desde : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874391916302561>
4. Gardner T. Declining amphibian populations : a global phenomenon in conservation biology. Anim Biodivers Conserv. 2001;24.2:25–44.
5. Organización Mundial de Sanidad Animal. Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2018 [Internet]. Paris: Office International des Epizooties. 2018 [citado 1 Mar 2018]. Disponible desde: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/>
6. Annis SL, Dastoor FP, Ziel H, Daszak P, Longcore JE. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. J Wildl Dis. 2004 Jul;40(3):420–8.
7. Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan J a T, Hyatt a D. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. Dis Aquat Organ [Internet]. 2004;60(2):141–8. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15460858>
8. Hyatt AD, Boyle DG, Olsen V, Boyle DB, Berger L, Obendorf D, et al. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. Dis Aquat Organ. 2007;73(3):175–92.
9. Organización Mundial de Sanidad Animal. Desarrollo y optimización de las ruebas de detección de ácido nucleico. En: Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres [Internet]. Paris: Office International des Epizooties; 2014.



Disponibile

desde:

[http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.6.3\\_NAD\\_ASSAYS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.6.3_NAD_ASSAYS.pdf)

10. Vitt LJ, Caldwell JP. Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles [Internet]. 3rd ed. Vol. XXXIII. San Diego, California: Academic Press; 2009. 1–697 p.
11. C. Kenneth Dodd J. Amphibian ecology and conservation. A Handbook of Techniques. New York: Oxford University Press; 2010. 556 p.
12. Stuart S, Hoffmann M, Chanson J, Cox N, Berridge R, Ramano P, et al. Threatened Amphibians of the World. Vol. 21. Barcelona, España: Lynx Edicions, IUCN, Conservation International; 2008. 2710–2718 p.
13. Halliday TR. Why amphibians are important. *Int Zoo Yearb.* 2008;42(1):7–14.
14. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. The IUCN red list of threatened species Version 3. Amphibians. 2017.
15. Blaustein AR, Wake DB. Populations : Declining Amphibian Global Phenomenon ? *TREE.* 1990;5(7):4–5.
16. Collins JP, Crump ML. Extinction in Our Times: Global Amphibian Decline. New York: Oxford University Press; 2009. 273 p.
17. Ron S, Guayasamin JM, Menéndez-Guerrero PA. Biodiversity and Conservation Status of Ecuadorian Amphibians. In: Heatwole H, Barrio-Amorós CL, Wilkinson JW, editors. *Amphibian Biology, Volume 9, Part 2.* Baulkham Hills, N.S.W: Surrey Beatty & Son; 2011. p. 129–70.
18. Van Rooij P, Martel A, Haesebrouck F, Pasmans F. Amphibian chytridiomycosis: A review with focus on fungus-host interactions. *Vet Res.* 2015;46(1):1–22.
19. Organización Mundial de Sanidad Animal. Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*. En: *Manual de las pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos.* OIE. Paris: Office International des Epizooties; 2012.
20. Densmore CL, Green DE. Diseases of amphibians. *ILAR J.* 2007;48(3):235–54.
21. Gascon C, Collins J, Moore R, Church D, McKay J, Joseph M, editors. *Amphibian Conservation Action Plan.* Suiza: The World Conservation Union; 2007. 64 p.



22. Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham A, Goggin CL, et al. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9031–6.
23. Longcore J, Pessier A, Nichols D. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogen to amphibians. *Mycologia*. 1999;91(2):219–27.
24. Weldon C, Preez LH, Hyatt AD, Reinhold M, Rick S. Origin of the amphibian chytrid fungus. Free Online Library. *Emerging Infect Diseases*. 2004;10(12):2100–5.
25. Fisher MC, Garner TWJ, Walker SF. Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annu Rev Microbiol*. 2009;63:291–310.
26. Daszak P, Berger L, Cunningham A, Hyatt D, Green DE, Speare R. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 1999;5(6):735–48. Disponible desde: [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2640803&tool=pmcentrez&render\\_type=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2640803&tool=pmcentrez&render_type=abstract)
27. Scheele B, Pasmans F, Berger L, Martel A, Beukema W, Acevedo AA, et al. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Wildl Dis*. 2019;363(March):1459–63.
28. Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends Ecol Evol*. 2010;25(2):109–18.
29. Bd-maps [Internet]. 2016. Disponible desde: <http://www.bd-maps.net/>
30. Olson DH, Aanensen DM, Ronnenberg KL, Powell CI, Walker SF, Bielby J, et al. Mapping the Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the Amphibian Chytrid Fungus. *PLoS One*. 2013;8(2):e56802.
31. Lips KR, Diffendorfer J, Mendelson JR, Sears MW. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biol*. 2008;6(3):0441–54.
32. Ron S. Declinación de anfibios del Ecuador: información general y primer reporte de chytridiomycosis para Sudamérica. *Froglog*. 2000;(42):2–3.
33. Proaño-Bolaños C, Merino A, Peña P, Salazar D. A midlatitude report of *Batrachochytrium*



*dendrobatidis* in Ecuador. *Froglog*. 2007;(82):3.

34. Korfel C. Distribution and environmental correlates between amphibians and the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. Ohio State University; 2012.
35. Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*. 2004;96(1):9–15.
36. Berger L, Hyatt AD, Speare R, Longcore JE. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ*. 2005;68(1):51–63.
37. Mutschmann F. Chytridiomycosis in Amphibians. *J Exot Pet Med* [Internet]. 2015;24(3):276–82. Disponible desde: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1557506315000762>
38. Latney L V., Klaphake E. Selected emerging diseases of amphibia. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* [Internet]. 2013;16(2):283–301. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2013.01.005>
39. Baitchman EJ, Pessier AP. Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Amphibian Chytridiomycosis. *Vet Clin North Am - Exot Anim Pract* [Internet]. 2013;16(3):669–85. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvex.2013.05.009>
40. Pessier a P, Mendelson JR. A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs. Version 2. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group. Apple Valley, MN: IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group; 2017.
41. Georoff TA, Moore RP, Rodriguez C, Pessier AP, Newton AL, McAloose D, et al. Efficacy of treatment and long-term follow-up of *Batrachochytrium dendrobatidis* PCR-positive anurans following itraconazole bath treatment. *J Zoo Wildl Med* [Internet]. 2013;44(2):395–403. Disponible desde: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1638/2012-0219R.1>
42. Brannelly LA, Richards-Zawacki CL, Pessier AP. Clinical trials with itraconazole as a treatment for chytrid fungal infections in amphibians. *Dis Aquat Organ*. 2012;101(2):95–104.
43. Berger L, Speare R, Kent A. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination [Internet]. 1999 Disponible desde: [http://arwh.taronga.net.au/sites/default/files/files-uploads/Attachment\\_1\\_Diagnosis\\_of\\_chytridiomycosis\\_in\\_amphibians\\_by\\_histologic\\_examination.pdf](http://arwh.taronga.net.au/sites/default/files/files-uploads/Attachment_1_Diagnosis_of_chytridiomycosis_in_amphibians_by_histologic_examination.pdf)



44. Berger L, Hyatt AD, Olsen V, Hengstberger SG, Boyle D, Marantelli G, et al. Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Dis Aquat Organ*. 2002;48(3):213–20.
45. Longcore JE. Recognizing , isolating , and culturing *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. 2003;1–2.
46. Dillon MJ, Bowkett AE, Michael J, Beckman KM, Brien MFO, Bates K, et al. Tracking the amphibian pathogens *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* using a highly specific monoclonal antibody and lateral- flow technology. *Microb Biotechnol*. 2017;10(2):381–94.
47. Viljoen G, Nel L, Crowter J. *Molecular Diagnostic PCR handbook*. Dordrecht: Springer; 2005. 315 p.
48. Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. *Microbiología e inmunología diagnóstica*. En: Brock, *Biología de los microorganismos*. 12th ed. Madrid: Pearson Educación S.A.; 2009. p. 1035–6.
49. Cunha M V., Inácio J, editors. *Veterinary Infection Biology: Molecular Diagnostics and High-Throughput*. New York: Humana Press; 2015. 534 p.
50. Organización Mundial de Sanidad Animal. *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*. En: *Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres*. Paris: Office International des Epizooties; 2014.
51. Che J, Chen HM, Yang JX, Jin JQ, Jiang K, Yuan ZY, et al. Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Mol Ecol Resour*. 2012;12(2):247–58.
52. Vences M, Thomas M, van der Meijden A, Chiari Y, Vieites D. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front Zool* [Internet]. 2005;2(5). Available from: <https://frontiersinzoology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-9994-2-5>
53. Brem F, Mendelson III JR, Lips K. *Field-Sampling Protocol for Batrachochytrium dendrobatidis from Living Amphibians, using Alcohol Preserved Swabs* [Internet]. Arlington; 2017. Report No.: Version 1.0. Disponible desde: [https://www.researchgate.net/publication/267778285\\_FIELD-](https://www.researchgate.net/publication/267778285_FIELD-)



SAMPLING\_PROTOCOL\_FOR\_BATRACHOCYTRIUM\_DENDROBATIDIS\_FROM\_LIVIN  
G\_AMPHIBIANS\_USING\_ALCOHOL\_PRESERVED\_SWABS

54. Shin J, Bataille A, Kosch TA, Waldman B. Swabbing often fails to detect amphibian chytridiomycosis under conditions of low infection load. *PLoS One*. 2014;9(10).
55. Helps C, Reeves N, Egan K, Howard P, Harbour D. Detection of *Chlamydomyces felis* and Feline Herpesvirus by Multiplex Real-Time PCR Analysis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2734–6.
56. Cantekin Z, Solmaz H, Ergun Y, Ozmen M. Development of Polymerase Chain Reaction assays with host-specific internal controls for *Chlamydomyces abortus*. *Vet Med (Praha)*. 2015;60(1):1–5.





**CAPÍTULO IX. ANEXOS**

**Anexo 1: Muestreo de especímenes.**

<b>Nº ID</b>	<b>Especie</b>	<b>Familia</b>	<b>Localidad</b>
1	<i>Pristimantis sp.</i>	Craugastoridae	Altarurco
2	<i>Pristimantis sp.</i>	Craugastoridae	Altarurco
3	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hemiphractidae	Altarurco
4	<i>Atelopus bomolochos</i>	Bufo	Altarurco
5	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hemiphractidae	Altarurco
6	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hemiphractidae	Altarurco
7	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hemiphractidae	Altarurco
8	<i>Pristimantis sp.</i>	Craugastoridae	Altarurco
9	<i>Pristimantis sp.</i>	Craugastoridae	Altarurco
10	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	Microhylidae	Challuabamba
11	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	Microhylidae	Challuabamba
12	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hemiphractidae	Challuabamba
13	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	Microhylidae	Challuabamba
14	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
15	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
16	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
17	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
18	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
19	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
20	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
21	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
22	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
23	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
24	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
25	<i>Atelopus exiguus</i>	Bufo	CCA-Amaru
26	<i>Atelopus exiguus</i>	Bufo	CCA-Amaru
27	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
28	<i>Atelopus nanay</i>	Bufo	CCA-Amaru
29	<i>Atelopus sp. Nov.</i>	Bufo	CCA-Amaru
30	<i>Atelopus sp. Nov.</i>	Bufo	CCA-Amaru
31	<i>Atelopus sp. Nov.</i>	Bufo	CCA-Amaru
32	<i>Atelopus sp. Nov.</i>	Bufo	CCA-Amaru
33	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
34	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
35	<i>Rhinella horribilis</i>	Bufo	CCA-Amaru
36	<i>Trachycephalus jordani</i>	Hylidae	CCA-Amaru
37	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	Bufo	CCA-Amaru



38	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	Bufonidae	CCA-Amaru
39	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	Bufonidae	CCA-Amaru
40	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	Bufonidae	CCA-Amaru
41	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	Bufonidae	CCA-Amaru
42	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	Bufonidae	CCA-Amaru
43	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	Bufonidae	CCA-Amaru
44	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Centrolenidae	CCA-Amaru
45	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Centrolenidae	CCA-Amaru
46	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Centrolenidae	CCA-Amaru
47	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Centrolenidae	CCA-Amaru
48	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Centrolenidae	CCA-Amaru
49	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Centrolenidae	CCA-Amaru
50	<i>Espadarana audax</i>	Centrolenidae	CCA-Amaru
51	<i>Espadarana audax</i>	Centrolenidae	CCA-Amaru
52	<i>Espadarana audax</i>	Centrolenidae	CCA-Amaru
53	<i>Epipedobates anthonyi</i>	Dendrobatidae	CCA-Amaru
54	<i>Epipedobates anthonyi</i>	Dendrobatidae	CCA-Amaru
55	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
56	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
57	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
58	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
59	<i>Hyloscirtus tapichalaca</i>	Hylidae	CCA-Amaru
60	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
61	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
62	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
63	<i>Gastrotheca monticola</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
64	<i>Gastrotheca monticola</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
65	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
66	<i>Gastrotheca monticola</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
67	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	Microhylidae	CCA-Amaru
68	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	Microhylidae	CCA-Amaru
69	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
70	<i>Hyloxalus vertebralis</i>	Dendrobatidae	CCA-Amaru
71	<i>Hyloxalus vertebralis</i>	Dendrobatidae	CCA-Amaru
72	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Hemiphractidae	CCA-Amaru
73	<i>Nymphargus cochramein</i>	Centrolenidae	CCA-Amaru
74	<i>Rhinella marina</i>	Bufonidae	CCA-Amaru
75	<i>Atelopus balios</i>	Bufonidae	CCA-Amaru
76	<i>Atelopus balios</i>	Bufonidae	CCA-Amaru
77	<i>Pristimantis sp.</i>	Craugastoridae	Cerro Negro. Sigsig



78	<i>Pristimantis sp.</i>	Craugastoridae	Cerro Negro. Sigsig
79	<i>Pristimantis sp.</i>	Craugastoridae	Cerro Negro. Sigsig
80	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hemiphractidae	Monay- Baguanchi
81	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Hemiphractidae	Monay- Baguanchi
82	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	Microhylidae	Monay- Baguanchi
83	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	Microhylidae	Monay- Baguanchi
84	<i>Atelopus nanay</i>	Bufoidea	CCA-Amaru
85	<i>Rhinella horribilis</i>	Bufoidea	CCA-Amaru



**Anexo 2:** Resultados del ensayo de la PCR convencional múltiple.

Nº ID	Especie	Control proceso	Diagnóstico de <i>Bd</i>
1	<i>Pristimantis sp.</i>	No amplifica	No válido
2	<i>Pristimantis sp.</i>	No amplifica	No válido
3	<i>Gastrotheca pseustes</i>	No amplifica	No válido
4	<i>Atelopus bomolochos</i>	No amplifica	No válido
5	<i>Gastrotheca pseustes</i>	No amplifica	No válido
6	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Válido	Negativo
7	<i>Gastrotheca pseustes</i>	No amplifica	No válido
8	<i>Pristimantis sp.</i>	No amplifica	No válido
9	<i>Pristimantis sp.</i>	Válido	Negativo
10	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	No amplifica	No válido
11	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	No amplifica	No válido
12	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Válido	Negativo
13	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	No amplifica	No válido
14	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
15	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
16	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
17	<i>Atelopus nanay</i>	Válido	Positivo
18	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
19	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
20	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
21	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
22	<i>Atelopus nanay</i>	Válido	Negativo
23	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
24	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
25	<i>Atelopus exiguus</i>	No amplifica	No válido
26	<i>Atelopus exiguus</i>	No amplifica	No válido
27	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
28	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
29	<i>Atelopus sp. Nov.</i>	No amplifica	No válido
30	<i>Atelopus sp. Nov.</i>	Válido	Negativo
31	<i>Atelopus sp. Nov.</i>	No amplifica	No válido
32	<i>Atelopus sp. Nov.</i>	Válido	Negativo
33	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Válido	Negativo
34	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Válido	Positivo
35	<i>Rhinella horribilis</i>	No amplifica	No válido
36	<i>Trachycephalus jordani</i>	No amplifica	No válido
37	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	Válido	Negativo
38	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	No amplifica	No válido
39	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	No amplifica	No válido
40	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	No amplifica	No válido
41	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	No amplifica	No válido
42	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	Válido	Negativo
43	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	No amplifica	No válido



44	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Válido	Negativo
45	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Válido	Negativo
46	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Válido	Negativo
47	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	No amplifica	No válido
48	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Válido	Negativo
49	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Válido	Negativo
50	<i>Espadarana audax</i>	No amplifica	No válido
51	<i>Espadarana audax</i>	No amplifica	No válido
52	<i>Espadarana audax</i>	Válido	Negativo
53	<i>Epipedobates anthonyi</i>	No amplifica	No válido
54	<i>Epipedobates anthonyi</i>	Válido	Negativo
55	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Válido	Negativo
56	<i>Gastrotheca litonedis</i>	No amplifica	No válido
57	<i>Gastrotheca litonedis</i>	No amplifica	No válido
58	<i>Gastrotheca litonedis</i>	No amplifica	No válido
59	<i>Hyloscirtus tapichalaca</i>	No amplifica	No válido
60	<i>Gastrotheca litonedis</i>	No amplifica	No válido
61	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Válido	Negativo
62	<i>Gastrotheca litonedis</i>	No amplifica	No válido
63	<i>Gastrotheca monticola</i>	Válido	Negativo
64	<i>Gastrotheca monticola</i>	Válido	Negativo
65	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Válido	Negativo
66	<i>Gastrotheca monticola</i>	No amplifica	No válido
67	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	No amplifica	No válido
68	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	No amplifica	No válido
69	<i>Gastrotheca litonedis</i>	No amplifica	No válido
70	<i>Hyloxalus vertebralis</i>	No amplifica	No válido
71	<i>Hyloxalus vertebralis</i>	No amplifica	No válido
72	<i>Gastrotheca pseustes</i>	No amplifica	No válido
73	<i>Nymphargus cochramein</i>	Válido	Negativo
74	<i>Rhinella marina</i>	No amplifica	No válido
75	<i>Atelopus balios</i>	No amplifica	No válido
76	<i>Atelopus balios</i>	No amplifica	No válido
77	<i>Pristimantis sp.</i>	No amplifica	No válido
78	<i>Pristimantis sp.</i>	No amplifica	No válido
79	<i>Pristimantis sp.</i>	No amplifica	No válido
80	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Válido	Negativo
81	<i>Gastrotheca litonedis</i>	No amplifica	No válido
82	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	Válido	Negativo
83	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	Válido	Negativo
84	<i>Atelopus nanay</i>	No amplifica	No válido
85	<i>Rhinella horribilis</i>	No amplifica	No válido



**Anexo 3:** Resultados del diagnóstico de *B. dendrobatidis* mediante PCR en tiempo real (qPCR).

N° ID	Especie	Resultado
6	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Positivo
9	<i>Pristimantis sp.</i>	Positivo
12	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Negativo
17	<i>Atelopus nanay</i>	Negativo
22	<i>Atelopus nanay</i>	Negativo
30	<i>Atelopus sp. Nov.</i>	Negativo
32	<i>Atelopus sp. Nov.</i>	Negativo
33	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Negativo
34	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Positivo
37	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	Negativo
42	<i>Atelopus ref. wampucrum</i>	Negativo
44	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Negativo
45	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Negativo
46	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Negativo
48	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Negativo
49	<i>Rulyrana mcdiarmidi</i>	Negativo
52	<i>Espadarana audax</i>	Negativo
54	<i>Epipedobates anthony</i>	Negativo
55	<i>Gastrotheca pseustes</i>	Positivo
61	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Negativo
63	<i>Gastrotheca monticola</i>	Negativo
64	<i>Gastrotheca monticola</i>	Positivo
65	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Negativo
73	<i>Nymphargus cochramein</i>	Positivo
80	<i>Gastrotheca litonedis</i>	Negativo
82	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	Positivo
83	<i>Ctenophryne aequatorialis</i>	Negativo
	<b>27</b>	



**Anexo 4:** Comparación de resultados de la PCR múltiple y qPCR.

N° ID	Control de proceso	Diagnóstico de <i>Bd</i>	
		PCR convencional múltiple	qPCR
6	Válido	-	+
9	Válido	-	+
12	Válido	-	-
17	Válido	+	-
22	Válido	-	-
30	Válido	-	-
32	Válido	-	-
33	Válido	-	-
34	Válido	+	+
37	Válido	-	-
42	Válido	-	-
44	Válido	-	-
45	Válido	-	-
46	Válido	-	-
48	Válido	-	-
49	Válido	-	-
52	Válido	-	-
54	Válido	-	-
55	Válido	-	+
61	Válido	-	-
63	Válido	-	-
64	Válido	-	+
65	Válido	-	-
73	Válido	-	+
80	Válido	-	-
82	Válido	-	+
83	Válido	-	-



Anexo 5: Formato del ensayo de PCR convencional múltiple.

<b>Laboratorio de Biología Molecular</b>		<b>01-FE-MBM-TaqPol</b>	
<b>Formato de ensayo: Taq ADN polimerasa</b>		<b>Versión:</b> 1.1	<b>Fecha:</b> 2016.08.23
		<b>Página:</b> 1 de 2	

**A.- Información del ensayo:**

Usuario:		Nombre del programa:	
Fecha:		Tamaño (bp):	
No:	Nombre del producto de PCR:	Observaciones:	
1	Bd 1a	1781-2621 - 590 Bd	88° 40' 82° 55'
2	Bd 2a	Bd 1a - Bd 2b	
3	± 590	APDF - ADFR	
4			
5			

**B.- Mezcla de reacción:**

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de premezcla:	por reacción:
Agua grado Biología Molecular.	No aplica.	No aplica.	91.25 µl	2.5 µl <del>18.25</del> 18.25
Tampon de amplificación 10X.	10X	1X	10.5 µl	2.5 µl
Solución de dNTP's.	10 mM	0.1 mM	1.25 µl	0.25 µl
Solución de MgCl <sub>2</sub> .	50 mM	2.0 mM	5 µl	1 µl
Oligonucleotido Bd 1a -F.	100 µM	0.8 µM	1 µl	0.2 µl
Oligonucleotido Bd 2a -R.	100 µM	0.8 µM	1 µl	0.2 µl
Oligonucleotido APDF -F.	µM	µM	1 µl	0.2 µl
Oligonucleotido ADFR -R.	µM	µM	1 µl	0.2 µl
Oligonucleotido _____ -F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleotido _____ -R.	µM	µM	µl	µl
Enzima Taq ADN polimerasa.	U/µl	U/µl	1 µl	0.2 µl
Muestra de ADN total.	µg/µl	µg/µl	10 µl	2 µl
<b>Volumen final:</b>			125 µl	25 µl

**C.- Perfil de temperaturas de amplificación:**

Paso:	Desnaturalización inicial:	Número de ciclos: 25				Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:			
Tiempo ( min ', seg ' ):	5' - "	30"	"	45"	5' - "	8	
Temperatura (°C):	95 °C	95 °C	62 °C	72 °C	72 °C	4 °C	
			50 °C < 60 °C				

**D.- Curva de temperatura de alineamiento:**

No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TM (°C):	50											40
Tubo No.:												(=)
Tubo No.:	1											2
Tubo No.:												





**Anexo 6:** Toma de muestras a ranas mediante hisopado.

