

# **Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos**

Claudio Borteiro

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Opción Zoología



Orientador: Dr. Martín Ubilla

Co-orientador: Dr. Claudio Martínez Debat

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Montevideo, abril de 2016



Citación sugerida/Suggested citation:

Borteiro, C. (2016) *Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, 259 p.

---

Foto de carátula: *Pleurodema bibroni* (Amphibia, Anura, Leiuperidae), Barra de Valizas, Departamento de Rocha, Uruguay. Ejemplar adulto emergiendo del suelo arenoso (autor: Francisco Kolenc).

Cover photo: *Pleurodema bibroni* (Amphibia, Anura, Leiuperidae), Barra de Valizas, Departamento de Rocha, Uruguay. Adult specimen emerging from sandy soil (author: Francisco Kolenc).

# **Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos**

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Opción Zoología

Autor: MSc. Claudio Borteiro.

*Sección Herpetología, Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo,  
25 de mayo 582, Montevideo 1100, Uruguay. E-mail: borteiro@gmail.com*

Orientador: Dr. Martín Ubilla.

*Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

Co-orientador: Dr. Claudio Martínez Debat.

*Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

Tribunal examinador:

Dra. Lina Bettucci.

Dr. Raúl Maneyro.

Dr. Daniel Naya.

*Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*



A mi madre,  
que siempre disfrutó cada uno de mis pequeños logros



# Prefacio

En esta tesis se presentan estudios sobre enfermedades infecciosas de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil, que son una continuación de trabajos previos publicados en el año 2009. En uno de ellos se comunicaron los primeros diagnósticos de infección por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en larvas de anfibios nativos de Uruguay (Borteiro *et al.* 2009, *Dis. Aquat. Organ.* 84, 159–162). Este patógeno es el agente causal de la quitridiomycosis, enfermedad cutánea asociada a declinaciones de anfibios a escala global. En el otro trabajo se discute la existencia de declinaciones poblacionales en anfibios de Uruguay contemporáneas a las ocurridas en otros continentes durante los años 1970s, y que llamaron fuertemente la atención de la comunidad científica (Kolenc *et al.* 2009, *Zootaxa* 1969, 1–35). Uno de los principales factores propuestos para estos fenómenos son las epidemias de quitridiomycosis. Con esta información disponible, me propuse en un principio estudiar su posible rol en declinaciones poblacionales de anfibios nativos. Durante el trabajo de campo identifiqué otras enfermedades que resultaron ser nuevas para el país o la región, por lo que decidí entonces incorporar dicha información. Ello requirió de la colaboración de numerosos colegas trabajando en herpetología, patología y parasitología veterinarias.

El manuscrito se divide en varias secciones, en la primera es una introducción general a las enfermedades y conservación de los anfibios, y a la metodología empleada. La segunda presenta resultados sobre el hallazgo de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios nativos e introducidos, y discute el posible origen de este patógeno en Uruguay en base a los diferentes haplotipos identificados. La tercera parte aborda el estudio de nuevos casos de infección por patógenos eucariotas de los Órdenes Dermocystida y Eccrinida (Clase Ichthyosporidia), en anfibios de Uruguay y sur de Brasil. A partir de estos hallazgos se realizó un análisis filogenético molecular de Dermocystida junto con una revisión taxonómica de las especies parásitas de anfibios. En la cuarta sección del manuscrito se describen otras enfermedades de la piel en anfibios nativos, causadas por macroparásitos y neoplasias. Finalmente, se discute la importancia de estos nuevos diagnósticos y se mencionan algunas perspectivas de investigación. Se provee además información anexa a los diferentes capítulos, incluyendo material de colecciones examinado, resultados de búsquedas bibliográficas, observaciones de campo y publicaciones. Las fotografías fueron tomadas por el autor, salvo indicación.





# Agradecimientos

Esta tesis fue posible gracias al enorme apoyo de mi familia, y de numerosos amigos y colegas. Mi madre María Cristina con mucho cariño escuchaba de mis avances y pacientemente me tradujo las publicaciones en alemán, mi padre Juan Carlos fue chofer y compañero en numerosas salidas de colecta; la paciencia y comprensión de mis hijos Sebastián y Mateo, mis sobrinas Dahiana y Melani, y de mi compañera Carina me alentaron a culminar este trabajo. Agradezco a Francisco Kolenc las incontables horas de campo y laboratorio compartidas, que son la base de esta tesis. Carlos Prigioni aportó su incansable humor en muchas salidas de campo, y me recibió en su casa durante las visitas a Treinta y Tres, junto a su esposa Alma y sus hijos Inés, Carolina y Santiago. Diego Baldo (Univ. Nac. Misiones) colaboró con la realización del análisis filogenético y discusión de resultados, aportó bibliografía y me ayudó en la confección de los mapas. Diego Barrasso (Univ. Nal. de la Plata – UNLP) fue una gran compañía en las salidas de campo y en las visitas a colecciones herpetológicas de Uruguay y Rio Grande do Sul. Para los estudios sobre rana toro conté con la valiosa ayuda y muestras aportadas por Gabriel Laufer. Las excelentes preparaciones histológicas que ilustran esta tesis fueron hechas por María Jesús Sabalsagaray en el laboratorio de Patología de Fac. de Veterinaria, donde mis amigos y colegas veterinarios Juan Carlos Cruz, José Manuel Verdes, Alejandro Crampet y Antonio Moraña brindaron un espacio de trabajo y participaron en los diagnósticos. Délio Baêta y Ariadne Fares Sabbag (UNESP - Rio Claro) hicieron posible las colectas y el trabajo de laboratorio durante mi estadía en São Paulo.

Agradezco especialmente a mis orientadores Martín Ubilla y Claudio Martínez Debat (Fac. de Ciencias) el haber sido un respaldo fundamental en todas las etapas, depositando su confianza en mí desde el inicio.

En los muestreos de campo en Uruguay colaboraron Diego Arrieta, Gabriel Laufer, Joaquín Villamil, Sofía Cortizas, Beco Mautone y Noelia Gobel (Museo Nac. Hist. Nat. Mdeo. – MNHN), Eduardo García, Marcelo Tedros, Mauricio Nieto, Ramiro Pereyra y Marcelo Iglesias. Marcelo Pallas, Graciela Duarte y Julio Balbuena, brindaron alojamiento durante las salidas de campo en Rocha y Rivera. El trabajo en el laboratorio contó con la ayuda incondicional de Mailen Arleo, y el apoyo de Adriana Esteves, Cora Chalar y Mónica Marín (Dpto. Bioquímica, Fac. Ciencias). Oscar Castro y José Manuel Venzal (Dpto. Parasitología, Fac. Veterinaria) ayudaron en la identificación de macroparásitos, aportaron bibliografía, y a la discusión sobre enfermedades parasitarias. El Prof. Kosuke Okada

(Univ. Iwate.) trabajó meticulosamente para obtener las micrografías electrónicas, con la asistencia de Juan Carlos Rosillo, Alejandra Kun (Inst. Inv. Biológicas “Clemente Estable”) y José Manuel Verdes. Numerosos propietarios y encargados de establecimientos y criaderos permitieron realizar colectas de anfibios y toma de muestras, entre ellos Héctor Ascencio, Washington dos Santos y Juan Manuel Reyes. Los controles positivos para el diagnóstico de *Batrachochytrium dendrobatidis* por PCR fueron gentileza de Joyce E. Longcore (Univ. Maine, Orono) y Alex. D. Hyatt (Australia Anim. Health Lab., Victoria). Agradezco el apoyo de Gonzalo Greif y Cecilia Portela del servicio de secuenciación de ADN del Institut Pasteur en Montevideo, y a Jorge Silvera (Dpto. Microbiología, Fac. Veterinaria) por la preparación de medios de cultivo microbiológicos.

Los siguientes colegas y amigos me permitieron desinteresadamente estudiar material en colecciones biológicas bajo su cuidado: Diego Arrieta (MNHN), Raúl Maneyro (Dpto. Zool. Vertebrados, Fac. Ciencias, Montevideo), Julián Faivovich, Martín Pereyra, Daiana Ferraro, Sebastián Barrionuevo (Mus. Arg. Cienc. Nat. “Bernardino Rivadavia” - MACN, Buenos Aires), Célio F.B. Haddad (UNESP - Rio Claro), Marcio Borges Martins (Univ. Fed. Rio Grande do Sul), Gláucia Fontes (Mus. Ciênc. Tecnol., Pontificia Univ. Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre), y Márcia Ferret Renner (Mus. Ciênc. Nat., Fundação Zoobot., Porto Alegre).

Parte de la bibliografía fue conseguida gracias a Martín Pereyra (MACN), Alejandra Lasso, Rosina Vilaró y Ana Carolina González (Biblioteca, Fac. Veterinaria), Marcela Skuhrová (Soc. Zool. Checa – Česká zoologická společnost, Praga) y Vladimír Vohralík (Katedra zologie, Univ. Karlova, Praga), Roberto Tadeu (Inst. Biológico, São Paulo) y Tarik Stark; Thomas Raffel (Oakland Univ., USA), Leonel Mendoza (Michigan State Univ., USA), Sarath N. Arseculeratne (Univ. Peradeniya, Sri Lanka) y Francisco Kolenc (MNHN) aportaron además algunas de las fotografías utilizadas. Carlos Prigioni (MNHN), Eduardo García, Manuel Martínez, Gilberto Dewailly, Daniel Carnevia (Inst. Inv. Pesqueras, Fac. Vet.) y Raúl Maneyro (ZVCB) brindaron valiosa información incluida en el manuscrito. Las publicaciones logradas fueron mejoradas con aportes de Thomas Raffel, Lee Berger, James N. Mills y Daiana Ferraro.

Este trabajo se financió parcialmente con una beca otorgada por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Montevideo, Uruguay) y fondos del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PEDECIBA – BIOLOGÍA, Univ. de la República.

Agradezco al PEDECIBA el haber podido realizar mi pos-graduación en Uruguay, y a los miembros del tribunal examinador, Lina Betucci, Raúl Maneyro y Daniel Naya (Fac. Ciencias) las sugerencias realizadas y la deferencia de aceptar la evaluación de este trabajo.

# TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
<b>PORTADA</b>	I
<b>PREFACIO</b>	III
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	V
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	VII
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	5
<b>I INTRODUCCIÓN GENERAL, OBJETIVOS Y METODOLOGÍA</b>	9
<u>Capítulo 1.</u> Introducción y objetivos	11
<u>Capítulo 2.</u> Materiales y métodos generales	25
<b>II QUITRIDIOMICOSIS</b>	33
<u>Capítulo 3.</u> Quitridiomycosis en anfibios nativos	45
<u>Capítulo 4.</u> Quitridiomycosis en anfibios introducidos	67
<u>Capítulo 5.</u> Haplotipos de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	81
<b>III ENFERMEDADES CAUSADAS POR ICHTHYOSPOREA</b>	91
<u>Capítulo 6.</u> Dermocistidiosis en anfibios de Uruguay y sur de Brasil: nuevos casos y revisión taxonómica de Dermocystida	95
<u>Capítulo 7.</u> Rinosporidiosis en <i>Hypsiboas pulchellus</i>	129
<u>Capítulo 8.</u> Ictiofonosis en <i>Hypsiboas pulchellus</i>	163
<b>IV OTRAS ENFERMEDADES</b>	175
<u>Capítulo 9.</u> Esparganosis en <i>Hypsiboas pulchellus</i>	177
<u>Capítulo 10.</u> Neopalsias	187
<u>Capítulo 11.</u> Trombidiasis	199
<b>V CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS</b>	205
<b>VI APÉNDICES</b>	211
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	255
<b>LISTA DE TABLAS</b>	259



# Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos

## Resumen

Las enfermedades de los anfibios ocupan un lugar destacado en estudios sobre conservación y manejo de especies en cautiverio. Existe actualmente un interés creciente por el estudio de enfermedades en poblaciones silvestres de anfibios, principalmente infectocontagiosas, debido al hallazgo de declinaciones poblacionales y extinción de especies asociadas a quitridiomycosis. Esta enfermedad cutánea es causada por dos especies de hongos del género *Batrachochytrium* (Rizophydiales). La más ampliamente distribuida es *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), presente en zonas templadas y tropicales de todos los continentes. Este microorganismo es endémico en algunas regiones como el bioma Mata Atlántica en Brasil, y se ha comportado como un patógeno emergente en otras, por ejemplo algunas zonas de América Central, Australia y Norteamérica. El mercado internacional de anfibios ha contribuido a su diseminación a escala global, siendo dos de los vectores más importantes la Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*) y la Rana de uñas africana (*Xenopus laevis*). Recientemente se han identificado varios linajes de *Bd*, entre ellos un linaje panzoótico global (*Bd*GPL) y otro nativo de Sudamérica (*Bd*-Brazil). En Uruguay, este hongo patógeno fue detectado por primera vez en un criadero de Rana toro en el año 1999, y los diagnósticos más viejos en anfibios nativos corresponden a larvas de anfibios colectadas en 2001 en el norte del país.

Otras enfermedades debidas a microorganismos eucariotas potencialmente mortales para los anfibios son las producidas por patógenos pertenecientes a la Clase Ichthyosporea. Estos agentes infecciosos producen en vertebrados enfermedades granulomatosas y ulcerativas, principalmente en piel y mucosas. Se reconocen dos Órdenes, Dermocystida y Eccrinida, ambos con representantes que afectan anfibios y peces. Los dermocistidios son patógenos de hospedadores homeotermos incluido el hombre (*Rhinosporidium seeberi*), y también de peces (*Dermocystidium*, *Sphaerothecum*) y anfibios (*Amphibiocystidium*, *Amphibiothecum*). Una especie descrita en anfibios neotropicales en 1940 en São Paulo, Brasil (*Dermosporidium*

*hyllarum*), es considerada actualmente un sinónimo de *R. seeberi*. Los Eccrinida parásitos de anfibios y peces se agrupan en el género *Ichthyophonus*, en el primer caso conocidos únicamente de Norteamérica.

El principal objetivo de esta tesis es presentar nuevos diagnósticos de infección por *Bd* y especies de Ichthyosporidia en anfibios silvestres de Uruguay y sureste de Brasil, discutiendo la importancia para su conservación. Se estudia la posible asociación de la quitridiomycosis con la declinación de las especies nativas de Uruguay, principalmente en *Physalaemus henselii* y *Pleurodema bibroni*. Se presenta además un análisis filogenético de Dermocystida incluyendo nuevos hallazgos de infección en anfibios de Brasil y Uruguay, junto con una revisión taxonómica de las especies parásitas de anfibios. Se revisa la información disponible sobre enfermedades de la piel causadas por microorganismos eucariotas en anfibios de la región, y se describen también nuevas dermatopatías parasitarias y neoplásicas en especies nativas.

Los diagnósticos de infección por *Bd* en especies nativas se realizaron mediante histología convencional con tinción de hematoxilina eosina, y también por PCR. Se obtuvieron muestras positivas correspondientes a 11 especies nativas (*Dendropsophus sanborni*, *Hypsiboas pulchellus*, *Julianus uruguayus*, *Leptodactylus latrans*, *Limnomedusa macroglossa*, *Melanophryniscus sanmartini*, *Odontophrynus americanus*, *Physalaemus henselii*, *Pleurodema bibroni*, *Pseudis minutus* y *Scinax squalirostris*), y ejemplares de anfibios introducidos pertenecientes a 3 especies (*Ceratophrys ornata*, *Xenopus laevis* y *Lithobates catesbeianus*). La prevalencia de infección en el total de la muestra fue 39 %, con una variación entre 10 y 88 % (muestras con  $n \geq 10$ ). No se registraron episodios de mortalidad natural debida a *Bd*, pero sí tres ejemplares de *L. macroglossa* mantenidos en cautiverio murieron con síntomas de quitridiomycosis. La infección por *Bd* presentó un comportamiento estacional en una población de *H. pulchellus*, siendo las prevalencias más altas en invierno y primavera temprana. Se observaron también altas prevalencias en Rana toro de criadero y silvestre. No se pudo detectar la infección por *Bd* en un muestreo histológico retrospectivo de ejemplares en colecciones colectados en Uruguay entre 1953 y 1972. El estudio de secuencias de un fragmento de la región ITS de *Bd* permitió identificar tres haplotipos en anfibios nativos, uno de los cuales se encontró además en las especies introducidas antes mencionadas. Todos ellos pertenecen al linaje *BdGPL*. Esta mayor diversidad de haplotipos en especies nativas es coherente con estudios retrospectivos realizados recientemente en el bioma Mata Atlántica en Brasil, donde tanto *BdGPL* como *Bd-Brazil* son endémicos, y su presencia es previa a la introducción de anfibios exóticos.

Los nuevos diagnósticos de infección por *Ichthyosporea* se realizaron en anuros hílidos de las especies *Hypsiboas pulchellus* y *Scinax fuscovarius*, de Uruguay y sureste de Brasil respectivamente. Algunos ejemplares de ambas especies presentaron lesiones cutáneas nodulares que al diagnóstico histopatológico evidenciaron esporangios capsulados ubicados en la dermis, repletos de pequeñas endosporas, característicos de infección por *Dermocystida*. La misma fue autolimitante en condiciones de laboratorio, y en la naturaleza las prevalencias más altas fueron registradas en otoño, invierno y primavera temprana; numerosos ejemplares presentaron coinfección con *Bd*. Un caso de infección en *S. fuscovarius* de São Paulo fue asignado a *Dermosporidium hylarum*. El análisis filogenético en base a secuencias del gen 18S permitió revalidar esta especie e incluirla en el género *Rhinosporidium* e identificar otras dos. Una de ellas es parásita de *H. pulchellus* y se asignó a *Rhinosporidium rwandae*, recientemente descrito de África tropical, lo cual sugiere una posible dispersión transoceánica. La otra especie corresponde a una nueva forma de *Sphaerothecum* parásita de *S. fuscovarius*, género identificado aquí por primera vez en el hemisferio sur y en hospedadores anfibios. Se propone además la sinonimización de *Amphibiocystidium* con *Rhinosporidium*, ya que la especie tipo *Amphibiocystidium ranae* forma parte de un clado asignado a este último género.

Entre los resultados obtenidos se destaca además el hallazgo de un ejemplar juvenil de *Hypsiboas pulchellus* del sur de Uruguay que presentó una tumoración lumbar, en la que se identificó mediante histopatología infección debida a *Eccrinida* (*Ichthyophonus* sp.). Este diagnóstico es el primero realizado en anfibios fuera de Norteamérica. Otras patologías relevantes de la piel halladas en anfibios de Uruguay fueron quistes parasitarios causados por larvas de cestodos del género *Spirometra* (esparganos) y por larvas de ácaros (*Trombiculidae*), y neoplasias. La esparganosis no había sido previamente observada en *H. pulchellus*, y la parasitosis por ácaros es novedosa en anfibios nativos. Las neoplasias descritas son un caso de lipoma subcutáneo en *Melanophryniscus sanmartini* y dos hallazgos de melanoforomas en *H. pulchellus*. Ambas neoplasias son raras en anfibios.

El presente trabajo provee una información de base para el futuro monitoreo de especies en declinación y el estudio de enfermedades de la piel potencialmente relevantes para su conservación. En este sentido, la especie ubicua *Hypsiboas pulchellus* se presenta como un interesante modelo para el estudio de enfermedades neoplásicas, infecciosas y parasitarias.





# Skin diseases of amphibians from Uruguay and southeastern Brazil: new diagnoses and potential effects

## Abstract

Amphibian diseases are a major issue in research concerning species conservation and management in captivity. Currently, there is an increasing interest on studies about diseases in wild amphibian populations, mainly infectious ones, due to the association of amphibian population declines and extinction with chytridiomycosis. This skin disease is caused by two fungal species of the genus *Batrachochytrium* (Rizophydiales). One of them, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), is distributed in temperate and tropical areas worldwide. It is endemic of some regions like the Atlantic Forest biome in Brazil and has become an emerging pathogen in others, for instance some areas in Middle America, Australia and North America. The international trade in amphibians has contributed to its global spread, being two of the most relevant vector species the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) and the African clawed frog (*Xenopus laevis*). Different lineages of *Bd* were recently identified, including a global panzootic lineage (*Bd*GPL) and one native from South America (*Bd*-Brazil). In Uruguay, this pathogenic fungus was detected for the first time in a bullfrog farm in 1999, and the oldest cases in native amphibians correspond to tadpoles collected in 2001 in the north.

Other diseases caused by eukaryotic microbes potentially lethal to amphibians are those caused by fungal-like pathogens of the Class Ichthyosporia. These infectious agents produce granulomatous and ulcerative diseases in vertebrates, mainly of skin and mucosae. Two Orders are currently recognized, Dermocystida and Eccrinida, both affecting amphibians and fish. The dermocystids are pathogens of vertebrate hosts including man (*Rhinosporidium seeberi*), and also of fish (*Dermocystidium*, *Sphaerothecum*) and amphibians (*Amphibiocystidium*, *Amphibiothecum*). One species was described from Neotropical amphibians in 1940 from São Paulo, Brazil (*Dermosporidium hylarum*), now considered

under the synonymy of *R. seeberi*. The Eccrinida parasitic on amphibians and fish are grouped in the genus *Ichthyophonus*, being known in the first only from North America.

The main objective of this thesis is to present new cases of infection by *Bd* and Ichthyosporea in wild amphibians from Uruguay, discussing their relevance for conservation. The possible association of chytridiomycosis with population declines of native species from Uruguay is studied, mainly *Physalaemus henselii* and *Pleurodema bibroni*. Besides, a phylogenetic analysis of Dermocystida is presented, including new cases from Brazil and Uruguay along with a taxonomic revision of species parasitic on amphibians. Parasitic and neoplastic skin diseases new to native amphibians are also described, and the available information on amphibian eukaryotic skin pathogens in the region is reviewed.

The diagnoses of infection by *Bd* were histological, with conventional haematoxylin and eosin staining, and also using PCR. Positive results were obtained from samples of 11 native species (*Dendropsophus sanborni*, *Hypsiboas pulchellus*, *Julianus uruguayus*, *Leptodactylus latrans*, *Limnomedusa macroglossa*, *Melanophryniscus sanmartini*, *Odontophrynus americanus*, *Physalaemus henselii*, *Pleurodema bibroni*, *Pseudis minutus* and *Scinax squalirostris*), and introduced specimens belonging to 3 species (*Ceratophrys ornata*, *Xenopus laevis* and *Lithobates catesbeianus*). Overall prevalence in the sample was 39 %, ranging between 10 and 88 % (samples with  $n \geq 10$ ). Spontaneous mortality episodes due to *Bd* in nature were not recorded, but three specimens of *L. macroglossa* maintained in captivity died from chytridiomycosis. The infection by *Bd* presented seasonal variation in a population of *H. pulchellus*, with higher prevalence in winter and early spring. High prevalences were also observed in wild and farmed bullfrogs. The infection could not be detected through histological analysis of specimens in collections collected in Uruguay between 1953 and 1972. The study of partial sequences of the ITS region of *Bd* allowed the identification of three haplotypes in native amphibians, one of which was also found in the abovementioned introduced species. All of them belong to the *Bd*GPL lineage. This higher haplotype diversity in native species agrees with recent retrospective studies on the Atlantic Forest biome in Brazil, where both *Bd*GPL and *Bd*-Brazil are endemic and its presence predates the introduction of alien amphibians.

New diagnoses of infection by Ichthyosporea were done on the hylid species *Hypsiboas pulchellus* and *Scinax fuscovarius*, from Uruguay and southeastern Brazil respectively. Some specimens of both species presented nodular skin lesions which evidenced at histopathology capsulated cysts in the dermis full of small endospores, characteristic of Dermocystida. This condition was self-limiting under laboratory conditions, and prevalence in nature was higher

during autumn, winter and early spring; numerous specimens exhibited also coinfection with *Bd*. A case of infection detected in a specimen of *S. fuscovarius* from São Paulo was assigned to *Dermosporidium hylarum*. The phylogenetic analysis based on sequences of the 18S gene allowed revalidation of this species in the genus *Rhinosporidium*, and the identification of other two. One of them parasitizes *H. pulchellus* and was assigned to *Rhinosporidium rwandae*, recently described from amphibians of tropical Africa and for which a transoceanic dispersal event is suggested. The second corresponds to a new species of *Sphaerothecum* parasitic on *S. fuscovarius*, a genus found herein for the first time in the southern hemisphere and in amphibian hosts. Besides, the synonymization of *Amphibiocystidium* with *Rhinosporidium* is proposed as it was not recovered as monophyletic, being its type species *A. ranae* assigned to the latter, which takes precedence.

Other relevant results are the finding of a juvenile specimen of *Hypsiboas pulchellus* from southern Uruguay bearing a swelling on its back, identified at histopathology as infection by Eccrinida (*Ichthyophonus* sp.). This diagnosis is the first on amphibians outside North America. Additional pathologic findings in amphibians from Uruguay worth of mention were larval parasitic cysts of tapeworms genus *Spirometra* (spargana) and mites (Trombiculidae), and neoplasms. Sparganosis was not previously reported in *H. pulchellus*, and the parasitism by mites is novel in native amphibians. The neoplasms are a case of subcutaneous lipoma in *Melanophryniscus sanmartini* and two findings of melanophoromas in *H. pulchellus*. Both neoplasms are rare in amphibians.

The present study provides background information for future studies on declining native amphibians and skin diseases potentially relevant for their conservation. In this sense, the ubiquitous anuran *Hypsiboas pulchellus* seems to be an interesting model for the study of neoplastic, infectious and parasitic diseases.

# **Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos**

Claudio Borteiro

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Opción Zoología



Orientador: Dr. Martín Ubilla

Co-orientador: Dr. Claudio Martínez Debat

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Montevideo, abril de 2016



Citación sugerida/Suggested citation:

Borteiro, C. (2016) *Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, 259 p.

---

Foto de carátula: *Pleurodema bibroni* (Amphibia, Anura, Leiuperidae), Barra de Valizas, Departamento de Rocha, Uruguay. Ejemplar adulto emergiendo del suelo arenoso (autor: Francisco Kolenc).

Cover photo: *Pleurodema bibroni* (Amphibia, Anura, Leiuperidae), Barra de Valizas, Departamento de Rocha, Uruguay. Adult specimen emerging from sandy soil (author: Francisco Kolenc).

# **Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos**

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Opción Zoología

Autor: MSc. Claudio Borteiro.

*Sección Herpetología, Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo,  
25 de mayo 582, Montevideo 1100, Uruguay. E-mail: borteiro@gmail.com*

Orientador: Dr. Martín Ubilla.

*Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

Co-orientador: Dr. Claudio Martínez Debat.

*Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

Tribunal examinador:

Dra. Lina Bettucci.

Dr. Raúl Maneyro.

Dr. Daniel Naya.

*Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*





A mi madre,  
que siempre disfrutó cada uno de mis pequeños logros



# Prefacio

En esta tesis se presentan estudios sobre enfermedades infecciosas de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil, que son una continuación de trabajos previos publicados en el año 2009. En uno de ellos se comunicaron los primeros diagnósticos de infección por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en larvas de anfibios nativos de Uruguay (Borteiro *et al.* 2009, *Dis. Aquat. Organ.* 84, 159–162). Este patógeno es el agente causal de la quitridiomycosis, enfermedad cutánea asociada a declinaciones de anfibios a escala global. En el otro trabajo se discute la existencia de declinaciones poblacionales en anfibios de Uruguay contemporáneas a las ocurridas en otros continentes durante los años 1970s, y que llamaron fuertemente la atención de la comunidad científica (Kolenc *et al.* 2009, *Zootaxa* 1969, 1–35). Uno de los principales factores propuestos para estos fenómenos son las epidemias de quitridiomycosis. Con esta información disponible, me propuse en un principio estudiar su posible rol en declinaciones poblacionales de anfibios nativos. Durante el trabajo de campo identifiqué otras enfermedades que resultaron ser nuevas para el país o la región, por lo que decidí entonces incorporar dicha información. Ello requirió de la colaboración de numerosos colegas trabajando en herpetología, patología y parasitología veterinarias.

El manuscrito se divide en varias secciones, en la primera es una introducción general a las enfermedades y conservación de los anfibios, y a la metodología empleada. La segunda presenta resultados sobre el hallazgo de *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios nativos e introducidos, y discute el posible origen de este patógeno en Uruguay en base a los diferentes haplotipos identificados. La tercera parte aborda el estudio de nuevos casos de infección por patógenos eucariotas de los Órdenes Dermocystida y Eccrinida (Clase Ichthyosporidia), en anfibios de Uruguay y sur de Brasil. A partir de estos hallazgos se realizó un análisis filogenético molecular de Dermocystida junto con una revisión taxonómica de las especies parásitas de anfibios. En la cuarta sección del manuscrito se describen otras enfermedades de la piel en anfibios nativos, causadas por macroparásitos y neoplasias. Finalmente, se discute la importancia de estos nuevos diagnósticos y se mencionan algunas perspectivas de investigación. Se provee además información anexa a los diferentes capítulos, incluyendo material de colecciones examinado, resultados de búsquedas bibliográficas, observaciones de campo y publicaciones. Las fotografías fueron tomadas por el autor, salvo indicación.



# Agradecimientos

Esta tesis fue posible gracias al enorme apoyo de mi familia, y de numerosos amigos y colegas. Mi madre María Cristina con mucho cariño escuchaba de mis avances y pacientemente me tradujo las publicaciones en alemán, mi padre Juan Carlos fue chofer y compañero en numerosas salidas de colecta; la paciencia y comprensión de mis hijos Sebastián y Mateo, mis sobrinas Dahiana y Melani, y de mi compañera Carina me alentaron a culminar este trabajo. Agradezco a Francisco Kolenc las incontables horas de campo y laboratorio compartidas, que son la base de esta tesis. Carlos Prigioni aportó su incansable humor en muchas salidas de campo, y me recibió en su casa durante las visitas a Treinta y Tres, junto a su esposa Alma y sus hijos Inés, Carolina y Santiago. Diego Baldo (Univ. Nac. Misiones) colaboró con la realización del análisis filogenético y discusión de resultados, aportó bibliografía y me ayudó en la confección de los mapas. Diego Barrasso (Univ. Nal. de la Plata – UNLP) fue una gran compañía en las salidas de campo y en las visitas a colecciones herpetológicas de Uruguay y Rio Grande do Sul. Para los estudios sobre rana toro conté con la valiosa ayuda y muestras aportadas por Gabriel Laufer. Las excelentes preparaciones histológicas que ilustran esta tesis fueron hechas por María Jesús Sabalsagaray en el laboratorio de Patología de Fac. de Veterinaria, donde mis amigos y colegas veterinarios Juan Carlos Cruz, José Manuel Verdes, Alejandro Crampet y Antonio Moraña brindaron un espacio de trabajo y participaron en los diagnósticos. Délio Baêta y Ariadne Fares Sabbag (UNESP - Rio Claro) hicieron posible las colectas y el trabajo de laboratorio durante mi estadía en São Paulo.

Agradezco especialmente a mis orientadores Martín Ubilla y Claudio Martínez Debat (Fac. de Ciencias) el haber sido un respaldo fundamental en todas las etapas, depositando su confianza en mí desde el inicio.

En los muestreos de campo en Uruguay colaboraron Diego Arrieta, Gabriel Laufer, Joaquín Villamil, Sofía Cortizas, Beco Mautone y Noelia Gobel (Museo Nac. Hist. Nat. Mdeo. – MNHN), Eduardo García, Marcelo Tedros, Mauricio Nieto, Ramiro Pereyra y Marcelo Iglesias. Marcelo Pallas, Graciela Duarte y Julio Balbuena, brindaron alojamiento durante las salidas de campo en Rocha y Rivera. El trabajo en el laboratorio contó con la ayuda incondicional de Mailen Arleo, y el apoyo de Adriana Esteves, Cora Chalar y Mónica Marín (Dpto. Bioquímica, Fac. Ciencias). Oscar Castro y José Manuel Venzal (Dpto. Parasitología, Fac. Veterinaria) ayudaron en la identificación de macroparásitos, aportaron bibliografía, y a la discusión sobre enfermedades parasitarias. El Prof. Kosuke Okada

(Univ. Iwate.) trabajó meticulosamente para obtener las micrografías electrónicas, con la asistencia de Juan Carlos Rosillo, Alejandra Kun (Inst. Inv. Biológicas “Clemente Estable”) y José Manuel Verdes. Numerosos propietarios y encargados de establecimientos y criaderos permitieron realizar colectas de anfibios y toma de muestras, entre ellos Héctor Ascencio, Washington dos Santos y Juan Manuel Reyes. Los controles positivos para el diagnóstico de *Batrachochytrium dendrobatidis* por PCR fueron gentileza de Joyce E. Longcore (Univ. Maine, Orono) y Alex. D. Hyatt (Australia Anim. Health Lab., Victoria). Agradezco el apoyo de Gonzalo Greif y Cecilia Portela del servicio de secuenciación de ADN del Institut Pasteur en Montevideo, y a Jorge Silvera (Dpto. Microbiología, Fac. Veterinaria) por la preparación de medios de cultivo microbiológicos.

Los siguientes colegas y amigos me permitieron desinteresadamente estudiar material en colecciones biológicas bajo su cuidado: Diego Arrieta (MNHN), Raúl Maneyro (Dpto. Zool. Vertebrados, Fac. Ciencias, Montevideo), Julián Faivovich, Martín Pereyra, Daiana Ferraro, Sebastián Barrionuevo (Mus. Arg. Cienc. Nat. “Bernardino Rivadavia” - MACN, Buenos Aires), Célio F.B. Haddad (UNESP - Rio Claro), Marcio Borges Martins (Univ. Fed. Rio Grande do Sul), Gláucia Fontes (Mus. Ciênc. Tecnol., Pontificia Univ. Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre), y Márcia Ferret Renner (Mus. Ciênc. Nat., Fundação Zoobot., Porto Alegre).

Parte de la bibliografía fue conseguida gracias a Martín Pereyra (MACN), Alejandra Lasso, Rosina Vilaró y Ana Carolina González (Biblioteca, Fac. Veterinaria), Marcela Skuhrová (Soc. Zool. Checa – Česká zoologická společnost, Praga) y Vladimír Vohralík (Katedra zologie, Univ. Karlova, Praga), Roberto Tadeu (Inst. Biológico, São Paulo) y Tarik Stark; Thomas Raffel (Oakland Univ., USA), Leonel Mendoza (Michigan State Univ., USA), Sarath N. Arseculeratne (Univ. Peradeniya, Sri Lanka) y Francisco Kolenc (MNHN) aportaron además algunas de las fotografías utilizadas. Carlos Prigioni (MNHN), Eduardo García, Manuel Martínez, Gilberto Dewailly, Daniel Carnevia (Inst. Inv. Pesqueras, Fac. Vet.) y Raúl Maneyro (ZVCB) brindaron valiosa información incluida en el manuscrito. Las publicaciones logradas fueron mejoradas con aportes de Thomas Raffel, Lee Berger, James N. Mills y Daiana Ferraro.

Este trabajo se financió parcialmente con una beca otorgada por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Montevideo, Uruguay) y fondos del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PEDECIBA – BIOLOGÍA, Univ. de la República.

Agradezco al PEDECIBA el haber podido realizar mi pos-graduación en Uruguay, y a los miembros del tribunal examinador, Lina Betucci, Raúl Maneyro y Daniel Naya (Fac. Ciencias) las sugerencias realizadas y la deferencia de aceptar la evaluación de este trabajo.

# TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
<b>PORTADA</b>	I
<b>PREFACIO</b>	III
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	V
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	VII
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	5
<b>I INTRODUCCIÓN GENERAL, OBJETIVOS Y METODOLOGÍA</b>	9
<u>Capítulo 1.</u> Introducción y objetivos	11
<u>Capítulo 2.</u> Materiales y métodos generales	25
<b>II QUITRIDIOMICOSIS</b>	33
<u>Capítulo 3.</u> Quitridiomycosis en anfibios nativos	45
<u>Capítulo 4.</u> Quitridiomycosis en anfibios introducidos	67
<u>Capítulo 5.</u> Haplotipos de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	81
<b>III ENFERMEDADES CAUSADAS POR ICHTHYOSPOREA</b>	91
<u>Capítulo 6.</u> Dermocistidiosis en anfibios de Uruguay y sur de Brasil: nuevos casos y revisión taxonómica de Dermocystida	95
<u>Capítulo 7.</u> Rinosporidiosis en <i>Hypsiboas pulchellus</i>	129
<u>Capítulo 8.</u> Ictiofonosis en <i>Hypsiboas pulchellus</i>	163
<b>IV OTRAS ENFERMEDADES</b>	175
<u>Capítulo 9.</u> Esparganosis en <i>Hypsiboas pulchellus</i>	177
<u>Capítulo 10.</u> Neopalsias	187
<u>Capítulo 11.</u> Trombidiasis	199
<b>V CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS</b>	205
<b>VI APÉNDICES</b>	211
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	255
<b>LISTA DE TABLAS</b>	259





# Enfermedades de la piel en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil: nuevos diagnósticos y posibles efectos

## Resumen

Las enfermedades de los anfibios ocupan un lugar destacado en estudios sobre conservación y manejo de especies en cautiverio. Existe actualmente un interés creciente por el estudio de enfermedades en poblaciones silvestres de anfibios, principalmente infectocontagiosas, debido al hallazgo de declinaciones poblacionales y extinción de especies asociadas a quitridiomycosis. Esta enfermedad cutánea es causada por dos especies de hongos del género *Batrachochytrium* (Rizophydiales). La más ampliamente distribuida es *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), presente en zonas templadas y tropicales de todos los continentes. Este microorganismo es endémico en algunas regiones como el bioma Mata Atlántica en Brasil, y se ha comportado como un patógeno emergente en otras, por ejemplo algunas zonas de América Central, Australia y Norteamérica. El mercado internacional de anfibios ha contribuido a su diseminación a escala global, siendo dos de los vectores más importantes la Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*) y la Rana de uñas africana (*Xenopus laevis*). Recientemente se han identificado varios linajes de *Bd*, entre ellos un linaje panzoótico global (*Bd*GPL) y otro nativo de Sudamérica (*Bd*-Brazil). En Uruguay, este hongo patógeno fue detectado por primera vez en un criadero de Rana toro en el año 1999, y los diagnósticos más viejos en anfibios nativos corresponden a larvas de anfibios colectadas en 2001 en el norte del país.

Otras enfermedades debidas a microorganismos eucariotas potencialmente mortales para los anfibios son las producidas por patógenos pertenecientes a la Clase Ichthyosporea. Estos agentes infecciosos producen en vertebrados enfermedades granulomatosas y ulcerativas, principalmente en piel y mucosas. Se reconocen dos Órdenes, Dermocystida y Eccrinida, ambos con representantes que afectan anfibios y peces. Los dermocistidios son patógenos de hospedadores homeotermos incluido el hombre (*Rhinosporidium seeberi*), y también de peces (*Dermocystidium*, *Sphaerothecum*) y anfibios (*Amphibiocystidium*, *Amphibiothecum*). Una especie descrita en anfibios neotropicales en 1940 en São Paulo, Brasil (*Dermosporidium*

*hyllarum*), es considerada actualmente un sinónimo de *R. seeberi*. Los Eccrinida parásitos de anfibios y peces se agrupan en el género *Ichthyophonus*, en el primer caso conocidos únicamente de Norteamérica.

El principal objetivo de esta tesis es presentar nuevos diagnósticos de infección por *Bd* y especies de Ichthyosporidia en anfibios silvestres de Uruguay y sureste de Brasil, discutiendo la importancia para su conservación. Se estudia la posible asociación de la quitridiomycosis con la declinación de las especies nativas de Uruguay, principalmente en *Physalaemus henselii* y *Pleurodema bibroni*. Se presenta además un análisis filogenético de Dermocystida incluyendo nuevos hallazgos de infección en anfibios de Brasil y Uruguay, junto con una revisión taxonómica de las especies parásitas de anfibios. Se revisa la información disponible sobre enfermedades de la piel causadas por microorganismos eucariotas en anfibios de la región, y se describen también nuevas dermatopatías parasitarias y neoplásicas en especies nativas.

Los diagnósticos de infección por *Bd* en especies nativas se realizaron mediante histología convencional con tinción de hematoxilina eosina, y también por PCR. Se obtuvieron muestras positivas correspondientes a 11 especies nativas (*Dendropsophus sanborni*, *Hypsiboas pulchellus*, *Julianus uruguayus*, *Leptodactylus latrans*, *Limnomedusa macroglossa*, *Melanophryniscus sanmartini*, *Odontophrynus americanus*, *Physalaemus henselii*, *Pleurodema bibroni*, *Pseudis minutus* y *Scinax squalirostris*), y ejemplares de anfibios introducidos pertenecientes a 3 especies (*Ceratophrys ornata*, *Xenopus laevis* y *Lithobates catesbeianus*). La prevalencia de infección en el total de la muestra fue 39 %, con una variación entre 10 y 88 % (muestras con  $n \geq 10$ ). No se registraron episodios de mortalidad natural debida a *Bd*, pero sí tres ejemplares de *L. macroglossa* mantenidos en cautiverio murieron con síntomas de quitridiomycosis. La infección por *Bd* presentó un comportamiento estacional en una población de *H. pulchellus*, siendo las prevalencias más altas en invierno y primavera temprana. Se observaron también altas prevalencias en Rana toro de criadero y silvestre. No se pudo detectar la infección por *Bd* en un muestreo histológico retrospectivo de ejemplares en colecciones colectados en Uruguay entre 1953 y 1972. El estudio de secuencias de un fragmento de la región ITS de *Bd* permitió identificar tres haplotipos en anfibios nativos, uno de los cuales se encontró además en las especies introducidas antes mencionadas. Todos ellos pertenecen al linaje *BdGPL*. Esta mayor diversidad de haplotipos en especies nativas es coherente con estudios retrospectivos realizados recientemente en el bioma Mata Atlántica en Brasil, donde tanto *BdGPL* como *Bd-Brazil* son endémicos, y su presencia es previa a la introducción de anfibios exóticos.

Los nuevos diagnósticos de infección por *Ichthyosporea* se realizaron en anuros hílidos de las especies *Hypsiboas pulchellus* y *Scinax fuscovarius*, de Uruguay y sureste de Brasil respectivamente. Algunos ejemplares de ambas especies presentaron lesiones cutáneas nodulares que al diagnóstico histopatológico evidenciaron esporangios capsulados ubicados en la dermis, repletos de pequeñas endosporas, característicos de infección por Dermocystida. La misma fue autolimitante en condiciones de laboratorio, y en la naturaleza las prevalencias más altas fueron registradas en otoño, invierno y primavera temprana; numerosos ejemplares presentaron coinfección con *Bd*. Un caso de infección en *S. fuscovarius* de São Paulo fue asignado a *Dermosporidium hylarum*. El análisis filogenético en base a secuencias del gen 18S permitió revalidar esta especie e incluirla en el género *Rhinosporidium* e identificar otras dos. Una de ellas es parásita de *H. pulchellus* y se asignó a *Rhinosporidium rwandae*, recientemente descrito de África tropical, lo cual sugiere una posible dispersión transoceánica. La otra especie corresponde a una nueva forma de *Sphaerothecum* parásita de *S. fuscovarius*, género identificado aquí por primera vez en el hemisferio sur y en hospedadores anfibios. Se propone además la sinonimización de *Amphibiocystidium* con *Rhinosporidium*, ya que la especie tipo *Amphibiocystidium ranae* forma parte de un clado asignado a este último género.

Entre los resultados obtenidos se destaca además el hallazgo de un ejemplar juvenil de *Hypsiboas pulchellus* del sur de Uruguay que presentó una tumoración lumbar, en la que se identificó mediante histopatología infección debida a Eccrinida (*Ichthyophonus* sp.). Este diagnóstico es el primero realizado en anfibios fuera de Norteamérica. Otras patologías relevantes de la piel halladas en anfibios de Uruguay fueron quistes parasitarios causados por larvas de cestodos del género *Spirometra* (esparganos) y por larvas de ácaros (Trombiculidae), y neoplasias. La esparganosis no había sido previamente observada en *H. pulchellus*, y la parasitosis por ácaros es novedosa en anfibios nativos. Las neoplasias descritas son un caso de lipoma subcutáneo en *Melanophryniscus sanmartini* y dos hallazgos de melanoforomas en *H. pulchellus*. Ambas neoplasias son raras en anfibios.

El presente trabajo provee una información de base para el futuro monitoreo de especies en declinación y el estudio de enfermedades de la piel potencialmente relevantes para su conservación. En este sentido, la especie ubicua *Hypsiboas pulchellus* se presenta como un interesante modelo para el estudio de enfermedades neoplásicas, infecciosas y parasitarias.



# Skin diseases of amphibians from Uruguay and southeastern Brazil: new diagnoses and potential effects

## Abstract

Amphibian diseases are a major issue in research concerning species conservation and management in captivity. Currently, there is an increasing interest on studies about diseases in wild amphibian populations, mainly infectious ones, due to the association of amphibian population declines and extinction with chytridiomycosis. This skin disease is caused by two fungal species of the genus *Batrachochytrium* (Rizophydiales). One of them, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), is distributed in temperate and tropical areas worldwide. It is endemic of some regions like the Atlantic Forest biome in Brazil and has become an emerging pathogen in others, for instance some areas in Middle America, Australia and North America. The international trade in amphibians has contributed to its global spread, being two of the most relevant vector species the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) and the African clawed frog (*Xenopus laevis*). Different lineages of *Bd* were recently identified, including a global panzootic lineage (*Bd*GPL) and one native from South America (*Bd*-Brazil). In Uruguay, this pathogenic fungus was detected for the first time in a bullfrog farm in 1999, and the oldest cases in native amphibians correspond to tadpoles collected in 2001 in the north.

Other diseases caused by eukaryotic microbes potentially lethal to amphibians are those caused by fungal-like pathogens of the Class Ichthyosporrea. These infectious agents produce granulomatous and ulcerative diseases in vertebrates, mainly of skin and mucosae. Two Orders are currently recognized, Dermocystida and Eccrinida, both affecting amphibians and fish. The dermocystids are pathogens of vertebrate hosts including man (*Rhinosporidium seeberi*), and also of fish (*Dermocystidium*, *Sphaerothecum*) and amphibians (*Amphibiocystidium*, *Amphibiothecum*). One species was described from Neotropical amphibians in 1940 from São Paulo, Brazil (*Dermosporidium hylarum*), now considered

under the synonymy of *R. seeberi*. The Eccrinida parasitic on amphibians and fish are grouped in the genus *Ichthyophonus*, being known in the first only from North America.

The main objective of this thesis is to present new cases of infection by *Bd* and Ichthyosporidia in wild amphibians from Uruguay, discussing their relevance for conservation. The possible association of chytridiomycosis with population declines of native species from Uruguay is studied, mainly *Physalaemus henselii* and *Pleurodema bibroni*. Besides, a phylogenetic analysis of Dermocystida is presented, including new cases from Brazil and Uruguay along with a taxonomic revision of species parasitic on amphibians. Parasitic and neoplastic skin diseases new to native amphibians are also described, and the available information on amphibian eukaryotic skin pathogens in the region is reviewed.

The diagnoses of infection by *Bd* were histological, with conventional haematoxylin and eosin staining, and also using PCR. Positive results were obtained from samples of 11 native species (*Dendropsophus sanborni*, *Hypsiboas pulchellus*, *Julianus uruguayus*, *Leptodactylus latrans*, *Limnomedusa macroglossa*, *Melanophryniscus sanmartini*, *Odontophrynus americanus*, *Physalaemus henselii*, *Pleurodema bibroni*, *Pseudis minutus* and *Scinax squalirostris*), and introduced specimens belonging to 3 species (*Ceratophrys ornata*, *Xenopus laevis* and *Lithobates catesbeianus*). Overall prevalence in the sample was 39 %, ranging between 10 and 88 % (samples with  $n \geq 10$ ). Spontaneous mortality episodes due to *Bd* in nature were not recorded, but three specimens of *L. macroglossa* maintained in captivity died from chytridiomycosis. The infection by *Bd* presented seasonal variation in a population of *H. pulchellus*, with higher prevalence in winter and early spring. High prevalences were also observed in wild and farmed bullfrogs. The infection could not be detected through histological analysis of specimens in collections collected in Uruguay between 1953 and 1972. The study of partial sequences of the ITS region of *Bd* allowed the identification of three haplotypes in native amphibians, one of which was also found in the abovementioned introduced species. All of them belong to the *Bd*GPL lineage. This higher haplotype diversity in native species agrees with recent retrospective studies on the Atlantic Forest biome in Brazil, where both *Bd*GPL and *Bd*-Brazil are endemic and its presence predates the introduction of alien amphibians.

New diagnoses of infection by Ichthyosporidia were done on the hylid species *Hypsiboas pulchellus* and *Scinax fuscovarius*, from Uruguay and southeastern Brazil respectively. Some specimens of both species presented nodular skin lesions which evidenced at histopathology capsulated cysts in the dermis full of small endospores, characteristic of Dermocystida. This condition was self-limiting under laboratory conditions, and prevalence in nature was higher

during autumn, winter and early spring; numerous specimens exhibited also coinfection with *Bd*. A case of infection detected in a specimen of *S. fuscovarius* from São Paulo was assigned to *Dermosporidium hylarum*. The phylogenetic analysis based on sequences of the 18S gene allowed revalidation of this species in the genus *Rhinosporidium*, and the identification of other two. One of them parasitizes *H. pulchellus* and was assigned to *Rhinosporidium rwandae*, recently described from amphibians of tropical Africa and for which a transoceanic dispersal event is suggested. The second corresponds to a new species of *Sphaerothecum* parasitic on *S. fuscovarius*, a genus found herein for the first time in the southern hemisphere and in amphibian hosts. Besides, the synonymization of *Amphibiocystidium* with *Rhinosporidium* is proposed as it was not recovered as monophyletic, being its type species *A. ranae* assigned to the latter, which takes precedence.

Other relevant results are the finding of a juvenile specimen of *Hypsiboas pulchellus* from southern Uruguay bearing a swelling on its back, identified at histopathology as infection by Eccrinida (*Ichthyophonus* sp.). This diagnosis is the first on amphibians outside North America. Additional pathologic findings in amphibians from Uruguay worth of mention were larval parasitic cysts of tapeworms genus *Spirometra* (spargana) and mites (Trombiculidae), and neoplasms. Sparganosis was not previously reported in *H. pulchellus*, and the parasitism by mites is novel in native amphibians. The neoplasms are a case of subcutaneous lipoma in *Melanophryniscus sanmartini* and two findings of melanophoromas in *H. pulchellus*. Both neoplasms are rare in amphibians.

The present study provides background information for future studies on declining native amphibians and skin diseases potentially relevant for their conservation. In this sense, the ubiquitous anuran *Hypsiboas pulchellus* seems to be an interesting model for the study of neoplastic, infectious and parasitic diseases.





## INTRODUCCIÓN GENERAL, OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

*Amphibia suffer the depredations of many kinds of parasites  
some of which are highly pathogenic, producing  
diseases which resemble those of man*

G. K. Noble, 1931



## Introducción y objetivos

### **Anfibios: generalidades y conservación**

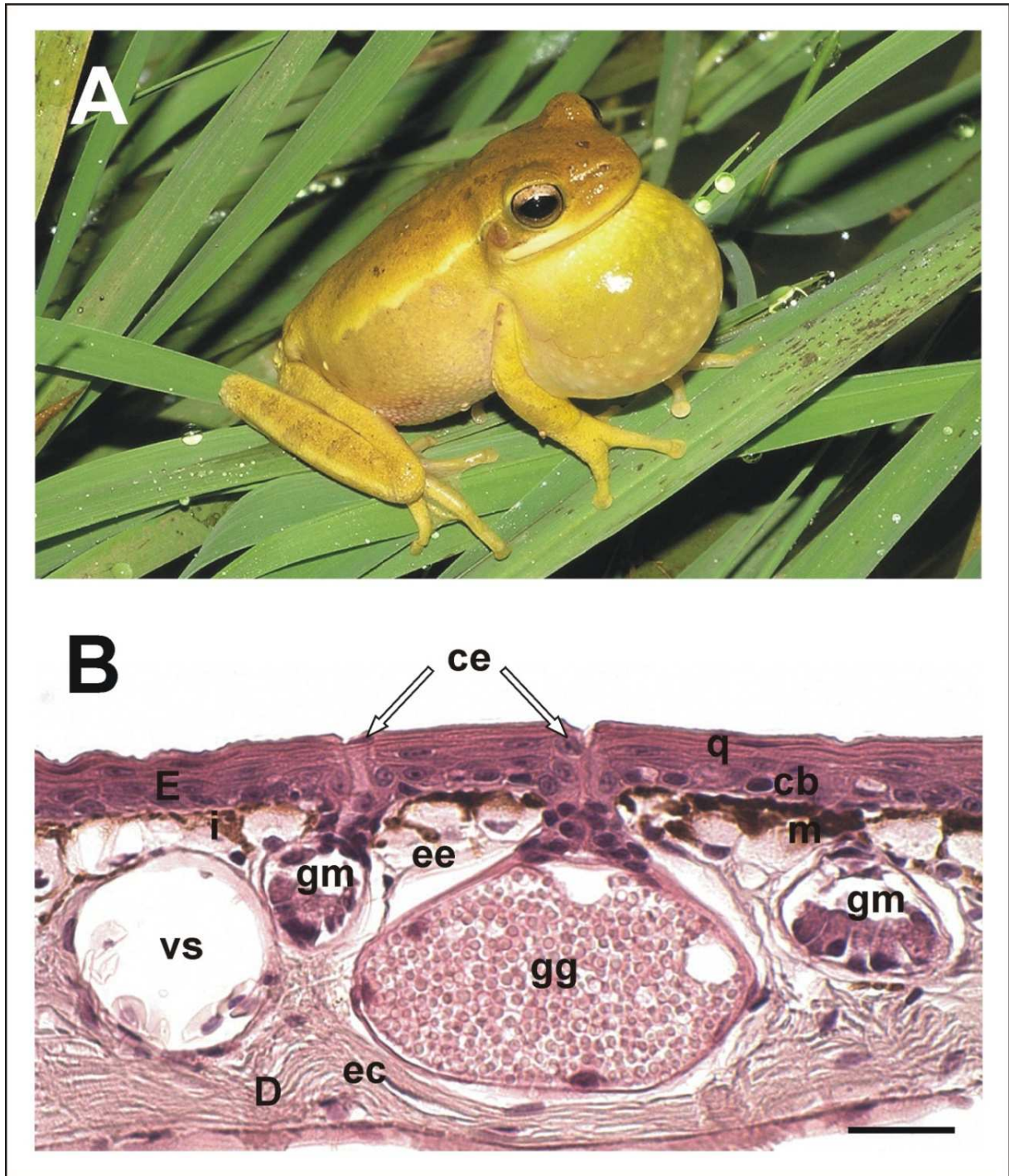
La Clase Amphibia se encuentra ampliamente distribuida en regiones tropicales y templadas del globo. Su abundancia en muy variados tipos de ambientes le confiere un importante rol en las cadenas tróficas tanto de ambientes acuáticos como terrestres (Duellman & Trueb 1986). Estos vertebrados son además importantes para distintas culturas ya que han sido y son utilizados con muy diversos fines, como consumo de carne, aplicaciones médicas, estéticos y en experimentación (Noble 1931). Asociado a estos usos existe actualmente un importante comercio internacional de anfibios, tanto de criaderos como de poblaciones silvestres (Schlaepfer *et al.* 2005). Los anfibios actuales pertenecen a tres grandes grupos, el Orden Anura que agrupa a la mayoría de las especies, conocidas como ranas y sapos, Caudata integrado por tritones y salamandras, y Gymnophiona que incluye formas ápodas de vida fosorial (Frost 2016).

Dos características notables de la mayoría de los anfibios son su ciclo de vida doble y la morfología de la piel. Los anuros y caudados tienen generalmente un ciclo de vida con una fase larval acuática en cuerpos de agua dulce, y hábitos terrestres o semiacuáticos luego de la metamorfosis (Duellman & Trueb 1986). Debido a este ciclo de vida complejo, los anfibios son vulnerables a condiciones ambientales adversas tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres. Su piel es en general lisa, muchas veces de llamativos colores, está desprovista de anexos queratinizados protectores, es muy rica en glándulas y bastante permeable al agua lo cual hace que la mayoría de las especies no sean muy resistentes a la desecación. La capa más externa de la piel o epidermis es generalmente muy delgada, formada usualmente por unas 5 a

7 capas de células, e incluye el estrato córneo queratinizado (1 o 2 capas), el estrato granuloso, estrato espinoso y la capa basal; la dermis subyacente consiste en dos capas de tejido conectivo, en la más gruesa o estrato esponjoso son abundantes las células pigmentarias o cromatóforos, glándulas de tipo seroso o mucoso, capilares y nervios, y en el estrato compacto predomina colágeno denso y tejido conectivo (Fox 1994). Diversas patologías que asientan en este delicado órgano tienen importancia en medicina veterinaria y son relevantes para la conservación de los anfibios (Wright & Whitaker 2001; Pessier & Mendelson 2010). La anatomía microscópica de la piel en un anfibio tipo se indica en la figura I.1.

El conocimiento sobre la diversidad de los anfibios se ha incrementado notablemente desde la segunda mitad del siglo pasado. Noble (1931) en su clásica obra *The Biology of the Amphibia* mencionan para ese entonces unas 1900 especies vivientes de anfibios, y poco más de medio siglo después Duellman y Trueb (1986) en *The Biology of Amphibians* indican la existencia de unas 3900 especies reconocidas. Actualmente, éstas son más de 7300, siendo Anura el grupo más numeroso mientras que Caudata está conformado por casi 700 especies principalmente del hemisferio norte, y Gymnophiona comprende unas 200 formas poco conocidas (Frost 2016). El descubrimiento de esta notable diversidad de anfibios en tiempos recientes contrasta con el creciente el número de publicaciones sobre declinación y extinción de numerosas especies (Gascon *et al.* 2007; Wake & Vredenburg 2008). Actualmente se considera que los anfibios son un grupo de vertebrados muy amenazado a escala global (Stuart *et al.* 2004). Esta crisis de biodiversidad es un fenómeno multifactorial (Blaustein & Wake 1995; Collins & Storfer 2003), cuyos efectos sobre los ecosistemas apenas comienzan a comprenderse (Whiles *et al.* 2006).

Al igual que sucede con otros grupos de vertebrados, las amenazas más importantes que enfrentan los anfibios son la alteración, pérdida y fragmentación de hábitat, especies exóticas invasoras, enfermedades infectocontagiosas, cambio climático global y polución, todas ellas muy asociadas a actividades humanas (Alford & Richards 1999; Collins & Storfer 2003; Beebee & Griffiths 2005; Navas & Otani 2007; Hamer & McDonnell 2008). Sin embargo, la crisis de conservación de los anfibios ha captado fuertemente la atención de la comunidad científica durante los últimos 25 años. Esto se debe a la detección a escala global de episodios de declinación poblacional y extinción de especies, catalogados como “enigmáticos”, y que ocurrieron en cortos períodos de tiempo en hábitats aún prístinos y poco alterados por el hombre (Barinaga 1990; Blaustein & Wake 1990; Phillips 1990; Wake 1991, Collins & Storfer 2003).



**FIGURA I.1.** *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae). **A**, ejemplar macho adulto vocalizando para atraer hembras hacia un sitio de reproducción (La Paloma, Dpto. de Rocha, Uruguay, 8/III/2008). **B**, corte histológico de piel dorsal de un ejemplar adulto (Sierra de Mahoma, Dpto. de San José, Uruguay, 9/VII/2005), tinción H&E. Barra = 20  $\mu$ m. Abreviaturas: D, dermis; E, epidermis; cb, capa basal de la epidermis; ce, conducto excretorio; ee, estrato esponjoso de la dermis; ec, estrato compacto de la dermis; gg, glándula granular; gm, glándula mucosa; i, iridóforos, m, melanóforos; vs, vaso sanguíneo; q, queratina.

Estos fenómenos contemporáneos de declinación poblacional comenzaron a escala global a partir de la década de los 1970s y afectaron numerosas especies (Carey 1993; Kagarise Sherman & Morton 1993; Laurance *et al.* 1996; 1997; Lips 1998; 1999; Green & Kagarise Sherman 2001; Ron *et al.* 2003; Burrowes *et al.* 2004; Stuart *et al.* 2004). Sus causas son difíciles de analizar por los efectos globales de las actividades humanas (Pechmann *et al.* 1991), pero se ha señalado a epidemias de enfermedades infectocontagiosas y al cambio climático global como las más relevantes (Daszak *et al.* 1999; Alexander & Eischeid 2001; Daszak *et al.* 2003; Lips *et al.* 2006; Pounds *et al.* 2006; Wake 2007).

El estudio de microorganismos patógenos como potencial causa de declinación y extinción de anfibios a escala global se incrementó considerablemente luego del descubrimiento de la quitridiomycosis. Esta enfermedad cutánea se detectó asociada a episodios de mortalidad masiva y severas declinaciones poblacionales en anfibios de América Central y Australia (Berger *et al.* 1998). La misma es causada por el hongo quitridiomyceto *Batrachochytrium dendrobatidis* (Chytridiomycota, Rhizophydiales), descrito por Longcore *et al.* (1999).

Otras enfermedades infecciosas de los anfibios que pueden afectar severamente la piel han sido asociadas a episodios de morbilidad y mortalidad naturales, entre las más relevantes se encuentran la dermocistidiosis e ictiofonosis causadas por microorganismos de la Clase Ichthyosporea (Pascolini *et al.* 2003; Raffel *et al.* 2006; Raffel *et al.* 2008), la infección por *Ranavirus* (Gray *et al.* 2009; Geng *et al.* 2011), y diversas micosis e infecciones bacterianas (ver Apéndice 1).

El estudio de patologías infecciosas y no infecciosas de los anfibios tiene actualmente un interés creciente debido al desarrollo de programas de conservación y manejo para conservación ex-situ, y mantenimiento de colonias en cautiverio con fines de investigación, docencia o comerciales (ej. Raverty & Reynolds 2001; Cullen & Owens 2002; Stacy & Parker 2004; Densmore & Green 2007; Gilbert *et al.* 2013). La información sobre enfermedades emergentes o nuevas patologías de este grupo adquiere entonces un particular interés para profesionales en distintas áreas de la biología que trabajan con anfibios.

## Estudio de las enfermedades de los anfibios

Las enfermedades que afectan a los anfibios han sido tradicionalmente poco estudiadas en relación a las de otros grupos de vertebrados (Reichenbach-Klinke & Elkan 1965; Mader & Divers 2013). Incluso en el caso de aquellas enfermedades a las que se dedica un gran esfuerzo de investigación como la quitridiomycosis, los mecanismos patogénicos y la causa de muerte han sido propuestos muy recientemente (Van Rooij *et al.* 2012; Voyles *et al.* 2012). De todas formas, el estudio de las enfermedades de anfibios silvestres ocupa un lugar destacado en la literatura científica relacionada a declinaciones poblacionales y conservación de este grupo, particularmente las enfermedades infectocontagiosas. Esto se debe a episodios de mortalidad y declinaciones poblacionales en tiempos recientes atribuidas a la quitridiomycosis, enfermedad considerada como un importante factor en la crisis de diversidad de los anfibios a escala global (Daszak *et al.* 2003; Muths & Hero 2010; Vredenburg *et al.* 2010).

La detección de morbilidad y mortalidad masivas en poblaciones silvestres de anfibios enfrenta la dificultad de que las carcasas persisten poco tiempo en el ambiente (Berger 2001), son consumidas por carroñeros, o bien los individuos enfermos son más susceptibles de ser predados. En el caso de las dermatopatías, la descomposición rápida de la piel en ejemplares recién muertos limita en gran medida el estudio de las enfermedades que afectan a este órgano. Por otra parte, la interpretación de hallazgos patológicos en anfibios no es sencilla, aún cuando puedan identificarse patógenos en carcasas o ejemplares moribundos, y se requiere entrenamiento y familiarización con la anatomía normal (Berger 2001).

La valoración de los efectos deletéreos de patógenos requiere además de una definición del concepto de salud así como de la identificación de indicadores de enfermedad. Las definiciones explícitas del concepto de salud y enfermedad no son comunes en libros de texto sobre medicina veterinaria. Las más generalizadas en la literatura reciente fueron examinadas por Gunnarsson (2006) y corresponden a diferentes enfoques, algunos de los cuales son aplicables al estudio de anfibios silvestres como el de la salud asimilada a “normalidad” (anatómica, comportamental), a “función biológica normal”, y a “homeostasis” (que implica rangos de normalidad). Estas definiciones operacionales no son fácilmente aplicables a casos concretos. Si consideramos por ejemplo a la quitridiomycosis de los anfibios, podremos ver que además de las dificultades mencionadas en el párrafo anterior en relación a la detección de brotes en condiciones naturales, los síntomas de la enfermedad varían entre especies de



hospedadores (Berger *et al.* 1999; Rachowicz & Vredenburg 2004). Con el desarrollo de técnicas moleculares basadas en la técnica de PCR convencional o de punto final (Annis *et al.* 2004) para la detección de la región ITS1 (Intergenic Transcriber Spacer 1) de *Batrachochytrium dendrobatidis*, la sensibilidad del diagnóstico mejoró notablemente con respecto de las técnicas histológicas. La posterior estandarización de protocolos de PCR en tiempo real aumentó aun más la sensibilidad de estos métodos, al punto de detectarse la presencia de tan solo una zoospora (Boyle *et al.* 2004; Kriger *et al.* 2006). Por este motivo, fueron sugeridos como la primera elección para el diagnóstico de quitridiomycosis (Kriger *et al.* 2006). Algunos autores indicaron luego que el umbral de consideración de un individuo como enfermo se situaría en un mínimo aproximado de 10.000 zoosporas (Vredenburg *et al.* 2010; Kinney *et al.* 2011). Sin embargo, la correcta valoración de este tipo de cuantificaciones resultó ser más compleja de lo que se pensaba al descubrirse poco después la existencia de numerosas cepas de *B. dendrobatidis* con diferente virulencia (Farrer *et al.* 2011; Schloegel *et al.* 2012), y que tienen además un número de copias de la región ITS que varía entre 10 y 144 (Longo *et al.* 2013). Por su parte, la histopatología aunque menos sensible, permite detectar lesiones diagnósticas de enfermedad y no simplemente la presencia del patógeno (ver discusión en Smith 2007).

En suma, la evaluación del rol de las enfermedades en declinaciones poblacionales de anfibios requiere de la valoración de datos obtenidos a partir de diversas fuentes. Éstas incluyen además del diagnóstico molecular, la sintomatología clínica, patología macro y microscópica, y datos sobre la dinámica espacial y temporal del hospedador y el patógeno.

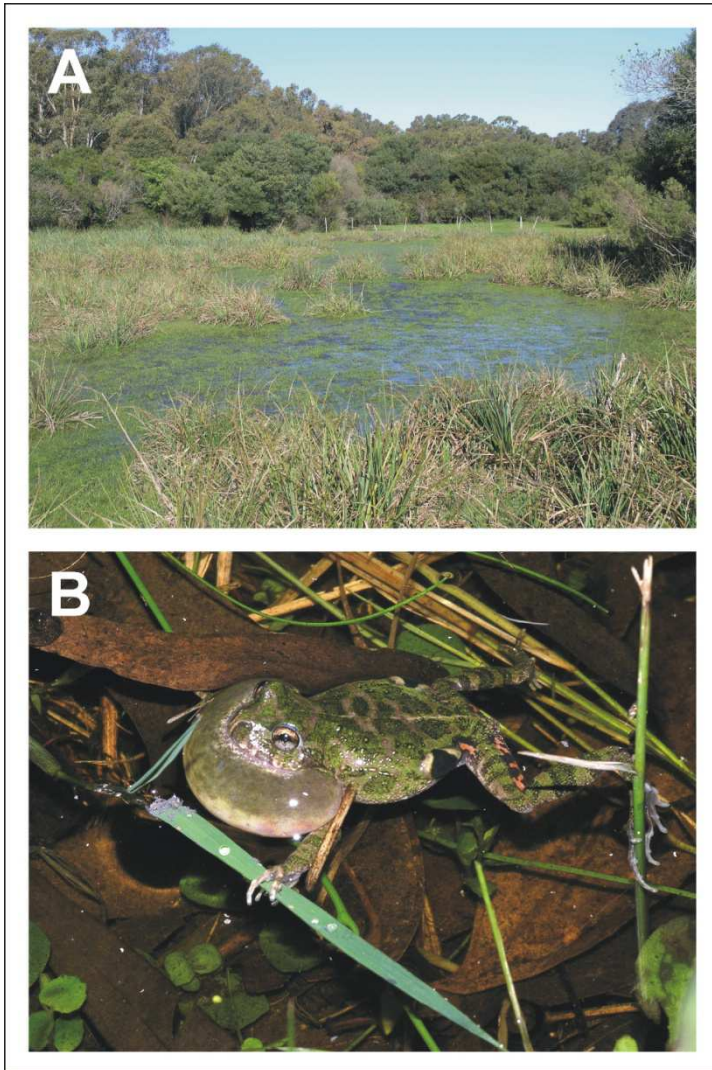
## **Anfibios de Uruguay: estado de conservación**

En Uruguay hay 47 especies de anfibios anuros nativos, una especie nativa de Gymnophiona, y una especie de anuro exótica asilvestrada (Maneyro & Carreira 2012). Nuestras especies nativas tienen una rica variedad de patrones morfológicos, ritmos de actividad estacional, modos reproductivos y uso diferencial de hábitats (Barrio 1953; 1964; 1977; Cei 1980; de Sá & Gerhau 1983; Langone & Prigioni 1985; Langone *et al.* 1985; Kolenc 1988; Prigioni & Garrido 1989; Langone 1993; Camargo *et al.* 2005; Kolenc *et al.* 2007; Canavero *et al.* 2008). Nuestra mayor riqueza de anfibios se encuentra en ambientes costeros y de serranías, en donde se encuentran tanto especies propias de estos ambientes como aquellas ampliamente distribuidas (Núñez *et al.* 2004; Prigioni *et al.* 2011).

Para varias de estas especies distintos autores han sugerido un delicado estado de conservación a nivel local utilizando diversos criterios y metodologías, siendo las principales amenazas propuestas la alteración y destrucción de hábitats por urbanización y otras actividades humanas (Maneyro & Langone 2001; Langone *et al.* 2004; Stuart *et al.* 2008; Canavero *et al.* 2010; Langone 2011; Arrieta *et al.* 2013; Carreira & Maneyro 2015; IUCN 2004”2015”). Otra amenaza potencial para nuestros anfibios es la presencia de poblaciones silvestres de la Rana toro norteamericana *Lithobates catesbeianus* (Laufer *et al.* 2008), una especie depredadora de otros anuros e invasora (Navas & Otani 2007). Las enfermedades infecciosas asociadas a declinaciones en anfibios a escala global que se han diagnosticado en Uruguay son la quitridiomycosis, identificada en criaderos comerciales de Rana toro (Mazzoni *et al.* 2003) y en especies nativas (Borteiro *et al.* 2009; Bardier *et al.* 2011), y la infección por *Ranavirus* detectada en un criadero de Rana toro (Galli *et al.* 2006).

El conocimiento de muchos aspectos de la historia natural de los anfibios de Uruguay es aún fragmentario, incluso muchos de ellos han sido descubiertos o descritos recientemente, como por ejemplo *Odontophrynus maisuma* (Rosset 2008), *Physalaemus cuvieri* (Maneyro & Beheregaray 2007) y *Scinax aromothyella* (Prigioni *et al.* 2005). La consideración de distintas categorías de amenaza para los anfibios en regiones donde su biología ha sido poco estudiada, puede inducir a un sesgo hacia la sobreestimación del número de especies en peligro (Pimenta *et al.* 2005). Numerosas especies nativas de anfibios han sido consideradas como amenazadas (Canavero *et al.* 2010; Langone 2011; Arrieta *et al.* 2013; Carreira & Maneyro 2015), siendo el único estudio de caso disponible sobre declinación poblacional el de *Pleurodema bibroni*, figura I.2. La declinación poblacional en esta especie sería al parecer multifactorial, y habría ocurrido en forma concomitante a las de otros anuros como *Ceratophrys ornata*, *Physalaemus fernandezae* y *Physalaemus henselii* (Kolenc *et al.* 2009).

En este trabajo se presentan resultados sobre el muestreo de enfermedades de anfibios nativos e introducidos en Uruguay, discutiendo el posible involucramiento de la quitridiomycosis en fenómenos de declinación poblacional ocurridos en especies nativas, principalmente *Physalaemus henselii* y *Pleurodema bibroni*. Se reportan además otros hallazgos patológicos en anfibios de Uruguay y sur de Brasil, principalmente enfermedades de la piel causadas por microorganismos eucariotas.



**FIGURA 1.2.** *Pleurodema bibroni* (Anura, Leptodactylidae). **A**, hábitat remanente en las márgenes del Arroyo Solís Grande, Jaureguiberry, Dpto. de Canelones, Uruguay (21/IX/2012). Se aprecian cuerpos de agua temporales y semi-permanentes con vegetación herbácea y *Eryngium*, rodeados de monte indígena y *Eucalyptus*. **B**, ejemplar macho vocalizando por la noche, misma localidad, 6/VI/2012).

## Objetivos

Los objetivos generales de esta tesis fueron:

- 1) Comunicar nuevos diagnósticos de enfermedades de la piel en anfibios, principalmente infecciosas, y valorar su importancia para la conservación del grupo.
- 2) Realizar una revisión del conocimiento disponible sobre enfermedades infecciosas de la piel en anfibios de la región, causadas por microorganismos eucariotas.

## Referencias

- Alexander, R.A. & Eischeid, J.K. (2001) Climate variability in regions of amphibian declines. *Conservation Biology*, 15(4), 930–942.
- Alford, R.A. & Richards, S.J. (1999) Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30, 133–165.
- Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P. & Longcore, J.E. (2004) A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(3), 420–428.
- Arrieta, D., Borteiro, C., Kolenc, F. & Langone, J.A. (2013) Anfíbios. En: *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares*, Soutullo, A., Clavijo, C. & Martínez-Lanfranco, J.A. (eds.), SNAP/DINAMA/MVOTMA, DICYT/MEC, Montevideo, 222 p.
- Bardier, C., Ghirardi, R., Levy, M. & Maneyro, R. (2011) First case of chytridiomycosis in an adult specimen of a native anuran from Uruguay. *Herpetological Review*, 42(1), 65–66.
- Barinaga, M. (1990) Where have all the froggies gone? *Science*, 247(4946), 1033–1034.
- Barrio, A. (1953) Sistemática, morfología y reproducción de *Physalaemus henselii* (Peters) y *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel) (Anura, Leptodactylidae). *Physis*, 20(59), 379–389.
- Barrio, A. (1964) Relaciones morfológicas, etoecológicas y zoogeográficas entre *Physalaemus henselii* (Peters) y *P. fernandezae* (Müller) (Anura, Leptodactylidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 20, 285–305.
- Barrio, A. (1977) Aportes para la elucidación del “status” taxonómico de *Pleurodema bibroni* Tschudi y *Pleurodema kriegi* (Müller) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Physis*, 37(93), 311–331.
- Beebee, T. J. C. & Griffiths, R. A. (2005) The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation*, 125(3), 271–285.
- Berger, L. (2001) *Diseases in Australian frogs*. Tesis de Doctorado, James Cook University, Australia. Disponible en: <http://eprints.jcu.edu.au/17586>
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K. R., Marantelli, G., & Parkes, H. (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 95(15), 9031–9036.
- Berger, L., Speare, R., Hyatt, A.D. (1999) Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. En: Campbell, A. (ed.) *Declines and disappearances of Australian frogs*, Environment Australia, Canberra, pp. 23–33.
- Blaustein, A.R. & Wake, D.B. (1990) Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends in Ecology and Evolution*, 5(7), 203–204.
- Blaustein, A.R. & Wake, D.B. (1995) The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American*, 272(4), 52–57.
- Borteiro, C., Aramburu, A., Kolenc, F. & Cruz, J.C. (2009) Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84(2), 159–162.
- Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T. & Hyatt, A.D. (2004) Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-

- time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60(2), 141–148.
- Burrowes, P.A., Joglar, R.L. & Green, D.E. (2004) Potential causes for amphibian declines for Puerto Rico. *Herpetologica*, 60(2), 141–154.
- Camargo, A., Naya, D., Canavero, A., da Rosa, I. & Maneyro, R. (2005) Seasonal activity and the body size-fecundity relationship in a population of *Physalaemus gracilis* (Boulenger, 1883) (Anura, Leptodactylidae) from Uruguay. *Annales Zoologici Fennici*, 42, 513–521.
- Canavero, A., Arim, M., Naya, D., Camargo, A., da Rosa, I. & Maneyro, R. (2008) Calling activity patterns in an anuran assemblage: the role of seasonal trends and weather determinants. *North Western Journal of Zoology*, 4(1), 29–41.
- Canavero, A., Carreira, S., Langone, J.A., Achaval, F., Borteiro, C., Camargo, A., da Rosa, I., Estrades, A., Fallabrino, A., Kolenc, F., López-Mendilaharsu, M.M., Maneyro, R., Meneghel, M., Núñez, D., Prigioni, C.M., & Ziegler, L. (2010) Conservation status assessment of the amphibians and reptiles of Uruguay. *Iheringia (Zoologia)*, 100(1), 5–12.
- Carey, C. (1993) Hypothesis concerning the causes of the disappearance of Boreal Toads from the mountains of Colorado. *Conservation Biology*, 7(2), 355–362.
- Carreira, S. & Maneyro, R. (2015) Lista roja de los anfibios del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la herpetofauna de Uruguay sobre la base de los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo, 64 p.
- Cei, J. M. 1980. Amphibians of Argentina. *Monitore Zoologico Italiano, Monografia*, 2, 1–609.
- Collins, J.P. & Storfer, A. (2003) Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions*, 9(2), 89–98.
- Cullen, B.R. & Owens, L. (2002) Experimental challenge and clinical cases of Bohle iridovirus (BIV) in native Australian anurans. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49(2), 83–92.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E., & Speare, R. (1999) Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*, 5(6), 735–748.
- Daszak, P., Cunningham, A.A. & Hyatt, A.D. (2003) Infectious disease and amphibian population decline. *Diversity and Distributions*, 9(2), 141–150.
- de Sá, R.O. & Gerhau, A. (1983) Observaciones sobre la biología de *Phyllomedusa iheringi*, Boulenger, 1885, (Anura, Hylidae). *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (2ª época)*, 1, 44–49.
- Densmore, C.L. & Green, D.E. (2007) Diseases of amphibians. *International Laboratory Animal Research Journal*, 48(3), 235–254.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. (1986) *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, London, 670 p.
- Farrer, R.A., Weinert, L.A., Bielby, J., Garner, T.W.J., Balloux, F., Clare, F., Bosch, J., Cunningham, A.A., Weldon, C., du Preez, L.H., Anderson, L., Kosakovsy Pond, S.L., Shahar-Golan, R., Henk, D.A. & Fisher, M.C. (2011) Multiple emergences of genetically diverse amphibian infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 108(46), 18732–18736.
- Fox, H. (1994) Chapter 1. The structure of the integument. En: Heatwole, H. & Barthalamus, G.T. (eds.), *Amphibian Biology*, Vol. 1, The Integument, Surrey Beatty & Sons.
- Frost, D.R. (2016) Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponible

- en: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (accedido el 22 de abril de 2016)
- Galli, L., Pereira, A., Márquez, A. & Mazzoni, R. (2006) *Ranavirus* detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. *Aquaculture*, 257(1–4), 78–82.
- Gascon, C., Collins, J.P., Moore, R.D., Church, D.R., McKay, J. & Mendelson III, J. (eds.) (2007) *Amphibian Conservation Action Plan*. Proceedings of the IUCN/SSC Amphibian Conservation Summit 2005. The World Conservation Union, Gland, 62 p.
- Geng, Y., Wang, K.Y., Zhou, Z.Y., Li, C.W., Wang, J., He, M., Yin, Z.Q. & Lai, W.M. (2011) First report of a *Ranavirus* associated with morbidity and mortality in farmed Chinese giant Salamanders (*Andrias davidianus*). *Journal of Comparative Pathology*, 145(1), 95–102.
- Gilbert, M., Bickford, D., Clark, L., Johnson, A., Joyner, P.H., Keatts, L.O., Khammvong, K., Vãn, L.N., Newton, A., Seow, T.P.W., Robertson, S., Silithammavong, S., Singhalath, S., Yang, A. & Seimon, T.A. (2013) Amphibian pathogens in southeast Asian frog trade. *EcoHealth*, 9(4), 386–398.
- Gray, J.M., Miller, D.L. & Hoverman, J.T. (2009) Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87(3), 243–266.
- Green, D.E. & Kagarise Sherman, C. (2001) Diagnostic histological findings in Yosemite Toads (*Bufo canorus*) from a die-off in the 1970s. *Journal of Herpetology*, 35(1), 92–103.
- Gunnarsson, S. (2006) The conceptualization of health and disease in veterinary medicine. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 48(1), 20.
- Hamer, A.J. & McDonnell, M.J. (2008) Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: a review. *Biological Conservation*, 141(10), 2432–2449.
- IUCN (2004–2015) *The IUCN Red List of Threatened Species*. Version 2014.3. Numerosos autores. Disponible en: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (accedido el 12 de Abril de 2015)
- Kagarise Sherman, C. & Morton, M.L. (1993) Population decline of Yosemite Toads in the eastern Sierra Nevada of California. *Journal of Herpetology*, 27(2), 186–198.
- Kinney, V.C., Heemeyer, J.L., Pessier, A.P. & Lanoo, M.J. (2011) Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: affirmation of Vredenburg’s “10,000 zoospore rule”. *PLOS ONE*, 6(3), e16708.
- Kolenc, F. (1988) Anuros del género *Melanophryniscus* en la República Oriental del Uruguay. *Aquamar*, 30(5), 16–21.
- Kolenc, F., Borteiro, C., Tedros, M. & Prigioni, C. (2007) The tadpole of *Scinax aromothyella* (Anura: Hylidae) from Uruguay. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 42(3), 175–180.
- Kolenc, F., Borteiro, C., Baldo, D., Ferraro, D. & Prigioni, C. (2009) The tadpoles and advertisement calls of *Pleurodema bibroni* Tschudi and *Pleurodema kriegi* (Müller), with notes on their geographic distribution and conservation status (Amphibia, Anura, Leiuperidae). *Zootaxa*, 1969, 1–35.
- Kruger, K.M., Hero, J.M. & Ashton, K.J. (2006) Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71(2), 149–154.
- Langone, J.A. (1993) Notas sobre *Phyllomedusa iheringii* Boulenger, 1885 (Amphibia, Anura, Hylidae). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 12(179), 1–7.
- Langone, J.A. (2011) Threats to Uruguayan amphibians. En: Heatwole, H., Barrio-Amorós,

- C.L. & Wilkinson, J.W. (eds.), *Amphibian Biology. Volume 9. Status of Decline of Amphibians: Western Hemisphere. Part 2 Uruguay, Brazil, Ecuador and Colombia*. Surrey Beatty & Sons, Australia, pp. 79–84.
- Langone, J.A. & Prigioni, C.M. (1985) Observaciones sobre una puesta de *Limnomedusa macroglossa* (D. & B., 1841) (Anura: Leptodactylidae). *Actas de las Jornadas de Zoología del Uruguay*, 1, 83–86.
- Langone, J.A., Maneyro, R. & Arrieta, D. (2004) Present knowledge of the status of amphibian conservation in Uruguay. En: *Collected DAPTF Working Group Reports: Ten years On*, Wilkinson, J.W. (ed.), Declining Amphibian population Task Force, Milton Keynes, pp. 83–87.
- Langone, J.A., Prigioni, C.M. & Venturino, L. (1985) Informe preliminar sobre el comportamiento reproductor y otros aspectos de la biología de *Phyllomedusa iheringi*, Boulenger, 1885 (Anura: Hylidae). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 11(152), 1–12.
- Laufer, G., Canavero, A., Núñez, D. & Maneyro, R. (2008) Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biological Invasions*, 10(7), 1183–1189.
- Laurance, W.F., McDonald, K.R. & Speare, R. (1996) Epidemic disease and the catastrophic decline of Australian rain forest frogs. *Conservation Biology*, 10(2), 406–413.
- Laurance, W.F., McDonald, K.R. & Speare, R. (1997) In defense of the epidemic disease hypothesis. *Conservation Biology*, 11(4), 1030–1034.
- Lips, K.R. (1998) Decline of a montane amphibian fauna. *Conservation Biology*, 12(1), 106–117.
- Lips, K.R. (1999) Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. *Conservation Biology*, 13(1), 117–125.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A.P. & Collins, J.P. (2006) Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 103(9), 3165–3170.
- Longcore, J.E., Pessier, A.P. & Nichols, D.K. (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov. a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219–227.
- Longo, A.V., Rodriguez, D., da Silva Leite, D., Toledo, L.F., Almeralla, C.M., Burrowes, P.A. & Zamudio, K.R. (2013) ITS1 copy number varies among *Batrachochytrium dendrobatidis* strains: implications for qPCR estimates of infection intensity from field-collected amphibian skin swabs. *PLoS ONE*, 8(3), e59499.
- Mader, D.R. & Divers, S.J. (2013) *Current Therapy in Reptile Medicine & Surgery*. Elsevier Saunders, St. Louis, 462 p.
- Maneyro, R. & Beheregaray, M. (2007) First record of *Physalaemus cuvieri* Fitzinger, 1826 (Anura, Leiuperidae) in Uruguay, with comments on the anuran fauna along the borderline between Uruguay - Brazil. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (2ª época)*, 16, 36–41.
- Maneyro, R. & Carreira, S. (2012) *Guía de anfibios del Uruguay*. Ediciones de la fuga, Montevideo, 207 p.
- Maneyro, R. & Langone, J.A. (2001) Categorización de los anfibios del Uruguay. *Cuadernos de Herpetología*, 15(2), 107–118.
- Mazzoni, R., Cunningham, A.A., Daszak, P., Apolo, A., Perdomo, E., Speranza, G. (2003) Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 995–998.
- Muths, E. & Hero, J.M. (2010) Amphibian declines: promising directions in understanding the role of

- disease. *Animal Conservation*, 13(Suppl. 1), 33–35.
- Navas, C.A. & Otani, L. (2007) Physiology, environmental change and anuran conservation. *Phyllomedusa*, 6(2), 83–103.
- Noble, G.K. (1931) *The Biology of the Amphibia*. McGraw-Hill, Nueva York, 577 p.
- Núñez, D., Maneyro, R., Langone, J. de Sá, R.O. (2004) Distribución de la fauna de anfibios del Uruguay. *Smithsonian Herpetological Information Service*, 134, 1–34.
- Pascolini, R., Daszak, P., Cunningham, A.A., Tei, S., Vagnetti, D., Bucci, S., Fagotti, A. & Di Rosa, I. (2003) Parasitism by *Dermocystidium ranae* in a population of *Rana esculenta* complex in Central Italy and description of *Amphibiocystidium n. gen.* *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(1), 65–74.
- Pechmann, J.H.K., Scott, D.E., Semlitsch, R.D., Caldwell, J.P., Vitt, L.J. & Whitfield Gibbons, J. (1991) Declining amphibian populations: the problem of separating human impacts from natural fluctuations. *Science*, 253(5022), 825–840.
- Pessier, A.P. & Mendelson, J.R., eds. (2010) *A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs*. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, Minnesota, USA, 229 p.
- Phillips, K. (1990) Where have all the frogs and toads gone? *BioScience*, 40(6), 422–424.
- Pimenta, B.V.S., Haddad, C.F.B., Nascimento, L.B., Cruz, C.A.G. & Pombal Jr., J.P. (2005) Comment on “Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide”. *Science*, 309(5743), 1999b.
- Pounds, J.A., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J.A., Fogden, M.P.L., Foster, P.N., La Marca, E., Masters, K.L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S.R., Sánchez-Azofeifa, G.A., Still, C.J. & Young, B.E. (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439(7073), 161–167.
- Prigioni, C.M. & Garrido, R.R. (1989) Algunas observaciones sobre la reproducción de *Melanophryniscus stelzneri montevidensis* (Anura, Bufonidae). *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (2ª época)*, 5, 13–14.
- Prigioni, C., Borteiro, C., Tedros, M. & Kolenc, F. (2005) *Scinax aromothyella*. *Herpetological Review*, 36(4), 464.
- Prigioni, C., Borteiro, C. & Kolenc, F. (2011) Amphibia and Reptilia, Quebrada de los Cuervos, Departamento de Treinta y Tres, Uruguay. *Check List*, 7(6), 763–767.
- Rachowicz, L.J. & Vredenburg, V.T. (2004) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1–2), 75–83.
- Raffel, T.R., Dillard, J.R. & Hudson, P.J. (2006) Field evidence of leech-borne transmission of amphibian *Ichthyophonus* sp. *Journal of Parasitology*, 92(6), 1256–1264.
- Raffel, T.R., Bommarito, T., Barry, D.S., Witiak, S.M. & Shackelton, L.A. (2008) Widespread infection of the Eastern red-spotted newt (*Notophthalmus viridescens*) by a new species of *Amphibiocystidium*, a genus of fungus-like mesomycetozoon parasites not previously reported in North America. *Parasitology*, 135(2), 203–215.
- Raverty, S. & Reynolds, T. (2001) Cutaneous chytridiomycosis in dwarf aquatic frogs (*Hymenochirus boettgeri*) originating from southeast Asia and in a western toad (*Bufo boreas*) from northeastern British Columbia. *Canadian Veterinary Journal*, 42(5), 385–386.
- Reichenbach-Klinke, H. & Elkan, E. (1965) *The*



- principal diseases of lower vertebrates.* Academic Press, London & New York, 600 p.
- Ron, S.R., Duellman, W.E., Coloma, L.A. & Bustamante, M.R. (2003) Population decline of the Jambato Toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology*, 37(1), 116–126.
- Rosset, S. D. 2008. New Species of *Odontophrynus* Reinhardt and Lütken 1862 (Anura: Neobatrachia) from Brazil and Uruguay. *Journal of Herpetology*, 42(1): 134-144.
- Schlaepfer, M.A., Hoover, C. & Dodd, K.D. Jr (2005) Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *Bioscience*, 55(3), 256–264.
- Schloegel, L.M., Toledo, L.F., Longcore, J.E., Greenspan, S.E., Vieira, C.A., Lee, M., Zhao, S., Wangen, C., Ferreira, C.M., Hipolito, M., Davies, A.J., Cuomo, C.A., Daszak, P. & James, T.Y. (2012) Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 21(21), 5162–5177.
- Smith, K.G. (2007) Use of quantitative PCR assay for amphibian chytrid detection: a comment on Kriger *et al.* (2006a, b). *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(3), 253–255.
- Stacy, B.A. & Parker, J.M. (2004) Amphibian oncology. *Veterinary Clinics of North America (Exotic Animal Practice)*, 7, 673–695.
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L. & Waller, R.W. (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702), 1783–1786.
- Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P. & Young, B.E. (2008) *Threatened Amphibians of the World*, Lynx Edicions, Barcelona - IUCN, Gland - Conservation International, Arlington, 758 p.
- Van Rooij, P., Martel, A., D'Herde, K., Brutyn, M., Croubels, S., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. (2012) Germ tube mediated invasion of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian skin is host dependent. *PLoS ONE*, 7(7), e41481.
- Voyles, J., Vredenburg, V.T., Tunstall, T.S., Parker, J.M., Briggs, C.J. & Rosenblum, E.B. (2012) Pathophysiology in Mountain yellow-legged Frogs (*Rana muscosa*) during a chytridiomycosis outbreak. *PLOS ONE*, 7(4), e35374, 1–6.
- Vredenburg, V.T., Knapp, R.A., Tunstall, T.S. & Briggs, C.J. (2010) Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 107(21), 9689–9694.
- Wake, D.B. (1991) Declining amphibian populations. *Science*, 253(5022), 860.
- Wake, D.B. (2007) Climate change implicated in amphibian and lizard declines. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 104(20), 8201–8202.
- Wake, D.B. & Vredenburg, V.T. (2008) Are we in the midst of sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 105(Suppl. 1), 11466–11473.
- Whiles, M.R., Lips, K.R., Pringle, C.M., Kilham, S.S., Bixby, R.J., Brenes, R., Connelly, S., Colon Gaud, J.C., Hunte Brown, M., Huryn, A.D., Montgomery, C. & Peterson, S. (2006) The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical ecosystems. *Frontiers in Ecology and Environment*, 4(1), 27–34.
- Wright, K.M. & Whitaker, B.R. (2001) *Amphibian medicine and captive husbandry*. Krieger Publishing Co., Malabar, Florida, 499 p.

## Materiales y métodos generales

### Área de estudio

Los especímenes de anfibios estudiados, tanto aquellos obtenidos en colectas como los presentes en colecciones biológicas, provinieron mayoritariamente del sur y este de Uruguay, y del sureste de Brasil. Las localidades visitadas durante el trabajo de campo en Brasil correspondieron a ambientes de los biomas Cerrado y Mata Atlántica, y áreas de transición entre ambos. Las mismas presentan una estación seca y una estación más lluviosa que comienza en la primavera, con precipitación variable según la región. Las localidades de estudio en Uruguay se ubican en la Región biogeográfica Provincia Pampeana, caracterizada por paisajes de praderas, principalmente de llanuras, interrumpidas por serranías que no superan los 1200 m sobre el nivel del mar (Cabrera & Willink 1973; Morrone 2014). El clima en esta región es templado con cuatro estaciones bien definidas, una temperatura media anual de 18 °C y precipitaciones que se sitúan entre los 1200 y 1400 mm acumulados anualmente, sin una estación seca o lluviosa bien definidas (Castaño *et al.* 2010). Las unidades de paisajes de Uruguay mencionadas en el texto siguen la propuesta de Evia & Gudynas (2000).

### Especímenes de estudio: colectas de anfibios y colecciones

Las colectas de anfibios se realizaron mediante visitas no sistemáticas a diversas localidades, procurando en cada sitio la detección de ejemplares enfermos. En dos localidades próximas entre sí, La Paloma y Laguna de Rocha, Dpto. de Rocha, Uruguay, se realizaron muestreos estacionales para observar variaciones en la prevalencia de algunas enfermedades.

Se muestrearon variados cuerpos de agua naturales y artificiales, tanto temporales como permanentes, en los que se capturaron anfibios anuros adultos, subadultos, juveniles y ocasionalmente larvas. Los ejemplares postmetamórficos en general se capturaron manualmente principalmente mediante búsqueda activa durante la noche, utilizando una fuente de luz artificial. Las larvas de especies nativas se colectaron con redes de mano y las de Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*) con redes de arrastre. Todos los ejemplares que fueron colectados se identificaron con un número de campo y se transportaron individualmente en bolsas de polietileno. Una vez en el laboratorio fueron sacrificados mediante aplicación cutánea de pasta de lidocaína 20 %, etiquetados individualmente, fijados en formalina 10 % y almacenados en etanol 70 % (v/v). El registro de la longitud hocico-cloaca (LHC) de ejemplares postmetamórficos se realizó con un calibre de acero SOMMET®. La nomenclatura taxonómica sigue a Frost (2016), y los estadios larvales corresponden a la clasificación de Gosner (1960). Las colectas en Uruguay se realizaron con autorización de la División Fauna, Dirección General de Recursos Naturales Renovables, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (permisos #1043/2001, 417/2003, 195/2006, 18/2009, 01/2010 y 199/2013). El protocolo de campo para la toma de muestras en el estudio de la quitridiomycosis fue aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.

Los especímenes colectados en Uruguay y Brasil se depositaron en la colección herpetológica del Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay (MNHN), y en la Colección herpetológica Célio F. B. Haddad, del Departamento de Zoología de la Universidad Estadual Paulista - UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo (CFBH), respectivamente. Adicionalmente se estudiaron ejemplares de las siguientes colecciones herpetológicas: ARGENTINA, Centro Nacional de Investigaciones Iológicas (CENAI), depositada en el Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, Buenos Aires, Argentina (MACN); BRASIL, colección de anfibios del Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica, Porto Alegre, Rio Grande do Sul (MCN), colección herpetológica del Museu de Ciências e Tecnologia, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul (MCP), colección herpetológica de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (UFRGS); URUGUAY, Colección de Batracios del Departamento de Zoología Vertebrados, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo (ZVCB). El material de estudio se detalla en el Apéndice 2.

## Registro de lesiones y diagnóstico anatomopatológico

Para el diagnóstico macro y microscópico se consultaron diversas fuentes sobre patología general de anfibios (Berger 2001; Wright & Whitaker 2001; Pessier & Mendelson 2010; Berger & Green 2012), malformaciones (Meteyer 2000), y enfermedades cutáneas de diversa etiología que se listan en el Apéndice 1. El registro de lesiones macroscópicas incluyó en un examen a simple vista, toma de fotografías, observación con una lupa binocular NIKON C-LEDS<sup>®</sup> a 10–50X, y fotografía bajo la lupa con una cámara y programa Micrometrics LE<sup>®</sup>.

El examen post-mortem de algunos ejemplares incluyó la disección de la cavidad celómica (Nichols 2001), y se realizó con la ayuda de una lupa binocular. Las muestras de tejidos para estudios histopatológicos se tomaron mediante disección con lupa, y se mantuvieron en el mismo líquido fijador de los especímenes. Las mismas fueron procesadas rutinariamente para examen histológico, incluidas en parafina líquida, seccionadas a 5  $\mu$ m, montadas en láminas de vidrio, y teñidas mayoritariamente con hematoxilina y eosina (H&E). Para ello los cortes montados en las láminas se desparafinaron con xilol 20 min y se hidrataron por pasajes en tres alcoholes decrecientes (100, 80, 50 % v/v, 10 min cada uno) y finalmente agua corriente 5 min. Se trataron luego con hematoxilina 10 min, se realizó un virado con agua corriente 10 min, y luego se aplicó eosina 3–4 min. Posteriormente las muestras se deshidrataron por pasajes en alcohol 96 y 100 % v/v, luego se realizó un baño con xilol de 10 min y se montaron en cubreobjetos con bálsamo de Canadá. En algunas rutinas se utilizó la tinción de Gram (modificación de Hücker) y PAS (ácido periódico de Schiff), con kits comerciales Biopack<sup>®</sup>. La primera se realizó coloreando las muestras desparafinadas montadas en portaobjetos en solución de cristal violeta 1 min, lavándolas luego con agua corriente, coloreando con solución lugol 1 min, y lavando nuevamente. Luego se decoloraron por arrastre con el decolorante durante 5 s, se lavó con agua corriente, y posteriormente se realizó coloración de contraste con solución de safranina por 1 min, con un lavado final en agua corriente y montaje de cubreobjetos. La tinción PAS se realizó también sobre muestras montadas desparafinadas, aplicando ácido periódico 0,5% durante 5 min, luego reactivo de Schiff 20 min, se lavó con agua corriente y luego se aplicó coloración de contraste con hematoxilina por 1 min y un último lavado con agua corriente previo al montaje con cubreobjetos. En algunos casos se realizaron frotis que se colorearon con “tinción 15” utilizando un kit comercial Biopur<sup>®</sup>; las muestras se fijaron con calor, se aplicó fijador 15 s, luego solución de colorantes tiazínicos 15 s, y solución de colorantes xanténicos 15 s.

Las preparaciones histológicas se observaron a 50–1000X con un microscopio binocular NIKON E100<sup>®</sup>, y se fotografiaron con una cámara y programa Micrometrics LE<sup>®</sup>. Las mediciones se realizaron sobre imágenes digitales con el programa Image J 1.45<sup>®</sup> (Abràmoff *et al.* 2004; disponible en <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>). A los efectos comparativos se hicieron preparaciones histológicas de piel de individuos en apariencia sanos o en su defecto de zonas libres de lesiones. En algunas muestras de piel con lesiones debidas a infección se realizaron estudios adicionales de microscopía electrónica, para estudiar la estructura de los microorganismos involucrados.

## Técnicas moleculares y secuencias de ADN

Muestras y extracción de ADN. La identificación de microorganismos patógenos se realizó en muestras obtenidas mediante hisopados de piel, y pequeños trozos de piel o del disco oral de larvas extraídos por disección. Los hisopados para la detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* se realizaron frotando 5 veces el abdomen y la superficie ventral de cada miembro y fueron conservados en tubos secos (Hyatt *et al.* 2007; Van Sluys *et al.* 2008). Las muestras de tejidos obtenidas mediante disección se fijaron en etanol 95 % v/v. Todas las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Las extracciones de ADN se realizaron con el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit QIAGEN<sup>®</sup>. En el caso de muestras conservadas en etanol, éste fue removido en un roto-evaporador de vacío. El procedimiento de extracción siguió las instrucciones del fabricante con modificaciones menores (indicadas entre paréntesis). A cada muestra, incluyendo el hisopo según el caso, se le agregaron 20 µl de proteinasa K y 180 µl del buffer correspondiente. Los tubos se agitaron para mezclar el contenido, se incubaron durante 3–4 horas a 56 °C, agitándose regularmente durante la incubación. Posteriormente cada lisado se agitó 15 s y se agregaron 200 µl de etanol absoluto y 200 µl de buffer de lisis “AL”. Se agitó nuevamente para un correcto mezclado y se colocó cada muestra en una columna de extracción (incluido el hisopo si lo hubiere). Se centrifugó luego en una microcentrífuga Eppendorf<sup>®</sup> a 6.000 g 1 min (se repitió este paso una vez más), descartándose el eluido y eventualmente el hisopo. Se adicionó a cada muestra 500 µl de buffer de lavado “AW1” y se centrifugó a 6.000 g 1 min descartándose el eluido. Seguidamente se agregaron 500 µl de buffer de lavado “AW2”, y se centrifugó a 20.000 g 3 min, nuevamente eliminando el eluido. Las columnas se transfirieron luego a un tubo de tipo Eppendorf de 1,5 ml, agregando a cada

una 50 µl de buffer de elución “AE” (o agua purificada en sistemas Milli-Q®), y se centrifugó a 6.000 g 1 min conservando el eluido final que contiene el ADN de la muestra (este último paso se repitió obteniéndose un eluido final de aproximadamente 100 µl).

PCR. Se utilizó la técnica convencional de punto final con kits comerciales de ADN polimerasa Pfu SBS Genetech®. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 µl con una concentración 1 µM de cada primer, 1X de buffer, 0,2 mM de dNTPs, 0,8 U de la enzima y 10 µl de muestra (conteniendo aproximadamente 10 ng de ADN). Las mismas fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida 12 %, utilizando buffer TBE (Trizma® 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Los geles se tiñeron con sales de plata siguiendo a Sanguinetti *et al.* (1994), fueron fijados por 5 min en una solución de etanol 95 % v/v (10 %) y ácido acético (5 %), luego se aplicó un baño de nitrato de plata (0,23 %) durante 8 min y se revelaron en una solución de hidróxido de sodio (3 %) y formaldehído (0,5 % de solución 37 % v/v). Los cebadores y controles correspondientes se detallan en cada caso.

Secuenciación. Algunos productos de PCR fueron purificados utilizando el Quiaquick PCR Purification kit, Qiagen®, siguiendo las instrucciones del fabricante con modificaciones menores. A cada muestra se agregó 5 veces el volumen de reacción de PCR del buffer de lavado inicial “PB”, y se centrifugó en microcentrífuga a 17000 g 1 min. Luego se adicionaron 750 µl del segundo buffer de lavado “PE” y se centrifugó nuevamente. Se realizaron dos eluciones, cada una con 50 µl de agua purificada en sistemas Milli-Q®, y finalmente se concentró el eluido en un roto-evaporador de vacío hasta alcanzar un volumen final de 15 µl.

Manejo de secuencias. Los productos de PCR purificados se secuenciaron en ambos sentidos en el Institut Pasteur, Montevideo, Uruguay. En el caso de individuos pertenecientes al Orden Dermocystida se obtuvieron secuencias por duplicado en Macrogen Inc., Seúl, Corea. Las secuencias crudas en forma de cromatogramas fueron editadas a ojo con el programa Chromas Lite 2.1.1® (Technelysium Pty. Ltd., Australia; <http://technelysium.com.au/>). Para confirmar su identidad se realizaron búsquedas en la base de datos GenBank mediante algoritmos BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Basic BLAST, nucleotide blast, nucleotide collection, megablast, optimize for highly similar sequences, “default” parameters). La calidad de los cromatogramas se controló realizando alineamientos con las secuencias FJ010548 de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Federici *et al.* 2008) y EF493028 de

*Amphibiocystidium viridescens* (Raffel *et al.* 2008), empleando el programa CLUSTALX 2.0.11 (Larkin *et al.* 2007; <http://www.clustal.org/clustal2/>). Posteriormente se eliminaron las zonas correspondientes a los cebadores utilizados.

## Algunas abreviaturas y símbolos utilizados

°, ', '' (grados, minutos, segundos; coordenadas geográficas)	min (minutos)
°C (grados Celsius)	ml (mililitros)
# (número)	mm (milímetros)
µl (microlitros)	mM (milimolar)
µm (micrómetros)	n (número de muestra)
$\bar{x}$ (media aritmética)	N (norte)
ADN (ácido desoxirribonucleico)	NE (noreste)
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	ng (nanogramos)
cm (centímetros)	nm (nanómetros)
com. pers. (comunicación personal)	obs. pers. (observación personal)
c.s.p. (cantidad suficiente para)	p (probabilidad estadística)
dNTPs (deoxinucleótidos trifosfatos)	P (proporción de la muestra)
Dpto. (Departamento)	PAS (ácido periódico de Schiff)
DS (desvío estándar)	pb (pares de bases de ADN)
E (este)	PCR (reacción en cadena de la polimerasa)
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	pg (picogramos)
g (gramos)	s (segundos)
H&E (tinción de hematoxilina y eosina)	S (sur)
IC (intervalo de confianza)	SE (sureste)
ITS1 (Intergenic Transcriber Spacer 1)	s.n.m (sobre el nivel del mar)
IUCN (= UICN, International Union for the Conservation of Nature)	U (unidades enzimáticas)
km (kilómetros)	UV (radiación ultravioleta)
LHC (longitud hocico-cloaca)	v/v (relación volumen/volumen)
m (metros)	W (oeste)
	X (factor de magnificación, microscopía)

## Referencias

- Abràmoff, M.D., Magalhães, P.J. & Ram, S.J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), 36-42.
- Berger, L. (2001) *Diseases in Australian frogs*. Tesis de Doctorado, James Cook University, Australia. Disponible en: <http://eprints.jcu.edu.au/17586>
- Berger, L. & Green, D.E. (2012) Amphibian Diseases. Australian Registry of Wildlife Health. En: *Wildlife Pathology Short Course*, Camden, Sydney, Australian Registry of Wildlife Health, pp. 26-48. Disponible en: <http://www.arwh.org/sites/default/files/files-uploads/04%20AMPHIBIAN%20DISEASES.pdf> (accedido el 26 de mayo de 2014)
- Cabrera, A.L. & Willink, A. (1973) *Biogeografía de America Latina*. Organización de Estados Americanos, Serie Biología, Monografía N° 13, 117 p.
- Castaño, J.P., Ceroni, M. & Bidegain, M. (2010) *Caracterización agroclimática del Uruguay 1980-2009*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay, 28 p.
- Evia, G. & Gudynas, E. (2000) *Ecología del paisaje en Uruguay*. Aportes para la conservación de la diversidad biológica. Junta de Andalucía – MVOTMA – AEI, Egondi Artes Gráficas, Sevilla, 173 p.
- Federici, S., Clemenzi, S., Favelli, M., Tessa, G., Andreone, F., Casiraghi, M. & Crottini, A. (2008) Identification of the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations of a plain area in the Northwest of Italy. *Herpetology Notes*, 1, 33-37.
- Frost, D.R. (2016) Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponible en: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (accedido el 22 de abril de 2016)
- Gosner, K.L. (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.
- Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Olsen, V., Boyle, D.B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F. & Collong, A. (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(3), 175-192.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Meteyer, C.U. (2000) *Field guide to malformations of frogs and toads with radiographic interpretations*. Biological Science Report, United States Geological Survey, 18 p.
- Morrone, J.J. (2014) Biogeographical regionalization of the Neotropical region. *Zootaxa*, 3782(1), 1-110.
- Nichols, D.K. (2001) Chapter 25. Necropsy. En: Wright, K.M. & Whitaker, B.R. (eds.) *Amphibian medicine and captive husbandry*, Krieger Publishing Co., Malabar, Florida, pp. 331-334.
- Pessier, A.P. & Mendelson, J.R., eds. (2010) *A manual for control of infectious diseases in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs*. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, Minnesota, 229 p.
- Raffel, T.R., Bommarito, T., Barry, D.S., Witiak, S.M.



- & Shackelton, L.A. (2008) Widespread infection of the Eastern red-spotted newt (*Notophthalmus viridescens*) by a new species of *Amphibiocystidium*, a genus of fungus-like mesomycetozoan parasites not previously reported in North America. *Parasitology*, 135(2), 203–215.
- Sanguinetti, C.J., Dias Neto, E. & Simpson, A.J.G. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17(5), 915–919.
- Van Sluys, M., Kriger, K.M., Phillott, A.D., Campbell, R., Skerratt, L.F. & Hero, J.M. (2008) Storage of samples at high temperatures reduces the amount of amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA detectable by PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 81(2), 93–97.
- Wright, K.M. & Whitaker, B.R. (2001) *Amphibian medicine and captive husbandry*, Krieger Publishing Co., Malabar, Florida, 499 p.

# QUITRIDIOMICOSIS

*Our expanding knowledge of B. dendrobatidis as an emerging disease of amphibians is exposing a complex interplay of variables, especially of temperature, phylogeny of species, and life history characteristics*

J. R. Longcore *et al.*, 2007

## Introducción

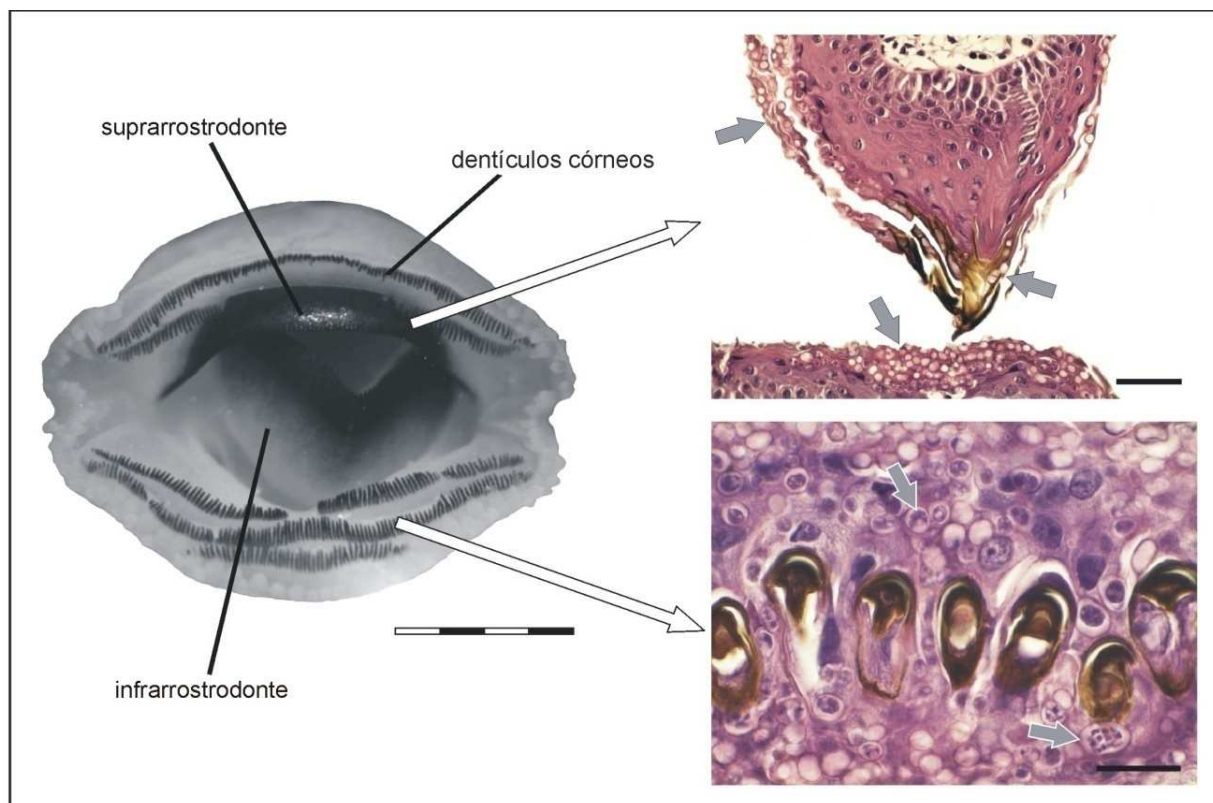
La quitridiomicosis de los anfibios es una enfermedad cutánea potencialmente letal luego de la metamorfosis, causada por hongos del género *Batrachochytrium* (Berger *et al.* 1998). Las dos especies descritas son los únicos representantes del Phylum Chytridiomycota parásitos de vertebrados (James *et al.* 2006). Una de ellas, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), se encuentra globalmente distribuida en África continental, Asia, Australia, Centroamérica,

Europa, Norteamérica, Nueva Zelanda, Sudamérica, y recientemente se ha encontrado en anfibios provenientes de Madagascar (Berger *et al.* 1998; Berger *et al.* 1999; Morell 1999; Mutschmann *et al.* 2000; Ron & Merino 2000; Bosch *et al.* 2001; Waldman *et al.* 2001; Olson *et al.* 2013; Kolby 2014; James *et al.* 2015). Durante el transcurso de este estudio una segunda especie patógena de anfibios originaria de Asia fue identificada, *Batrachochytrium salamandrivorans*, causante de mortalidad y declinación poblacional en salamandras de Europa (Martel *et al.* 2013; Martel *et al.* 2014).

Las dos especies de *Batrachochytrium* son muy similares, su ciclo de vida es en apariencia simple, tienen zoosporas móviles y flageladas que alcanzan los hospedadores a través del medio acuático; una vez que comienzan su fase parasitaria dan origen a un esporangio que produce zoosporas, liberadas por un tubo de descarga (Berger *et al.* 2005; Martel *et al.* 2013). Las zoosporas carecen de pared celular resistente y son sensibles a la desecación, calor y agentes químicos a concentraciones usuales de desinfección (Longcore *et al.* 1999; Johnson *et al.* 2003). No se han descrito esporangios resistentes en el ambiente como ocurre con otros hongos (Di Rosa *et al.* 2007; Morgan *et al.* 2007).

Estos quitridiomicetos parásitos crecen en tejidos queratinizados por lo que su detección puede realizarse con facilidad en muestras de piel de anfibios adultos y en el epitelio adyacente a estructuras orales queratinizadas de las larvas (Berger *et al.* 1999a; Hyatt *et al.* 2007; Martel *et al.* 2013). Las larvas de anfibios anuros infectadas presentan pérdida variable de queratina no letal que es característica de la presencia de *Bd* aunque no exclusiva de la quitridiomycosis (Knapp & Morgan 2006; Symonds *et al.* 2007), figura II-1. La infección puede ser transmitida al metamorfo, etapa del desarrollo en la cual ya se registra mortalidad (Rachowicz & Vredenburg 2004). Los ejemplares post-metamórficos pueden contraer la infección al estar en contacto con un medio acuático conteniendo zoosporas, o bien en forma indirecta a través de superficies contaminadas por individuos infectados (Kolby *et al.* 2015). En anfibios adultos afectados clínicamente se observa excesiva ecdisis, eritema y decoloración de piel en abdomen y muslos, con hiperqueratosis, hiperplasia e hipertrofia (Rachowicz & Vredenburg 2004).

En adultos puede ocurrir invasión de las capas profundas de la epidermis mediante el desarrollo de un tubo germinal que penetra en las células epiteliales (Van Rooij *et al.* 2012). La afección severa de la piel en ejemplares post-metamórficos puede conducir a la muerte a consecuencia de una alteración de la función de osmorregulación de la piel, que cursa con hiponatremia e hipocaliemia, acompañadas de una capacidad de rehidratación disminuida (Voyles *et al.* 2007; Voyles *et al.* 2009; Carver *et al.* 2010; Voyles *et al.* 2012).



**FIGURA II.1.** Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en larvas de anuros de Uruguay. Izquierda: disco oral normal de *Pleurodema bibroni*. Barra = 0,5 mm. Derecha, arriba: corte histológico sagital de un disco oral de una larva de *Physalaemus henselii*. El suprarrostródonte presenta escasa queratina (color oscuro), el infrarrostródonte ha desaparecido y hay numerosos esporangios (flechas), tinción H&E. Barra = 50 μm. Derecha abajo: corte histológico transversal de un disco oral de *Hypsiboas pulchellus*. El tejido entre los denticulos córneos presenta numerosos esporangios maduros (flechas), tinción H&E. Barra = 20 μm.

La piel de los anfibios postmetamórficos es entonces el único órgano requerido para el diagnóstico de infección por *Bd*, que tiene predilección por zonas ventrales del tronco y miembros (Berger *et al.* 1999a). A la histopatología son diagnósticas la presencia de esporangios esféricos en el estrato córneo de la epidermis (y epitelio del disco oral de las larvas) que miden entre 6 y 15 μm, con un contenido homogéneo basofílico que da origen a 4–10 esporas de 1–2 μm en estadios más maduros, y pueden observarse tubos de descarga (2–4 μm) y septos internos en esporangios vacíos (Berger *et al.* 1999a).

La infección puede presentar una marcada estacionalidad en zonas templadas, siendo menor su incidencia en épocas cálidas (Berger *et al.* 2004; Kriger & Hero 2006). Temperaturas medias (17–23 °C) parecen aumentar la virulencia de *Bd* y disminuir la respuesta inmune de algunos hospedadores (Ribas *et al.* 2009). Temperaturas más altas

favorecerían la inmunidad, así como también la curación y eliminación del patógeno (Woodhams *et al.* 2003; Chatfield & Richards-Zawacki 2011; Forrest & Schlaepfer 2011). *Bd* es capaz de persistir en el ambiente en sedimentos húmedos y eventualmente podría ser transportado en plumas de aves (Johnson & Speare 2005) y hospedadores no anfibios como crustáceos y reptiles (Kilburn *et al.* 2011; McMahon *et al.* 2013). Recientemente se ha comprobado también que puede ser dispersado por la lluvia y el viento (Kolby *et al.* 2015a).

## **Quitridiomicosis y declinaciones poblacionales**

Desde poco después de su descubrimiento, la quitridiomicosis debida a *Bd* ha sido considerada como una enfermedad emergente debido a los numerosos reportes sobre la aparente expansión de su rango de distribución y/o incremento de su impacto sobre poblaciones silvestres de anfibios (ej. Daszak *et al.* 1999; Bradley *et al.* 2002; Daszak *et al.* 2003; Muths *et al.* 2003; Rachowicz *et al.* 2006; Schloegel *et al.* 2006; Ryan *et al.* 2008; Fisher *et al.* 2009; Kriger & Hero 2009; Lötters *et al.* 2009; Todd-Thompson *et al.* 2009; Vredenburg *et al.* 2010; Mendelson III *et al.* 2014). Esta enfermedad se ha encontrado asociada a episodios de morbilidad y mortalidad masiva que han derivado en declinaciones poblacionales y extinción de numerosas especies a escala global, por ejemplo en América Central y norte de Sudamérica, principalmente en hábitats montañosos (Berger *et al.* 1998; Lips *et al.* 2003; Lips *et al.* 2004; La Marca *et al.* 2005; Whitfield *et al.* 2005; Lips *et al.* 2006; Pounds *et al.* 2006; Skerratt *et al.* 2007).

El origen de las epidemias de quitridiomicosis ha sido motivo de debate. Se han propuesto dos hipótesis sobre el origen de las declinaciones asociadas a esta enfermedad. Una es la “hipótesis de epidemia”, según la cual *Bd* sería endémico de las regiones donde han ocurrido declinaciones debidas a quitridiomicosis, y la “hipótesis del patógeno nuevo” sugiere que *Bd* habría ingresado recientemente en estos lugares (Rachowicz *et al.* 2005). En el primer caso factores naturales o antropogénicos habrían desencadenado las epidemias en nuevos hospedadores susceptibles (Carey 1993). El cambio climático global se ha sugerido como un factor importante para el desarrollo de las mismas (Pounds *et al.* 2006; Alford *et al.* 2007, Pounds *et al.* 2007), sin embargo esto ha sido cuestionado por otros autores (Lips *et al.* 2008; Kriger 2009). Por otra parte, la escasa variabilidad genética de *Bd* conocida hasta no hace mucho tiempo se consideró como una fuerte evidencia a favor de la hipótesis del patógeno nuevo (Morgan *et al.* 2007; James *et al.* 2009). La principal vía de diseminación de *Bd*

entonces propuesta fue el tráfico internacional de anfibios vivos, siendo los vectores potenciales más importantes las ranas africanas del género *Xenopus* muy utilizadas en investigación y aplicaciones biomédicas (Weldon *et al.* 2004; Fisher & Garner 2007), y la Rana toro norteamericana *Lithobates catesbeianus* criada para consumo humano (Daszak *et al.* 2004; Hanselmann *et al.* 2004; Rachowicz *et al.* 2005; Garner *et al.* 2006; Fisher & Garner 2007; Schloegel *et al.* 2009).

Estudios más recientes en base a variabilidad de marcadores moleculares en *Bd* sugirieron que el origen de este patógeno podría ser Japón (Goka *et al.* 2009). Sin embargo, un reciente estudio de Rodríguez *et al.* (2014) en anfibios de la Región Neotropical se encontró en el bioma Mata Atlántica la mayor la variación genética de *Bd* conocida hasta el momento. Este trabajo planteó un nuevo escenario sobre la historia evolutiva de *Bd*, desafiando las hipótesis sobre sus orígenes asiático y africano. Los autores encontraron prevalencias estables (~ 20 %) por más de 100 años en diferentes familias de anfibios de la Mata Atlántica, para cepas pertenecientes al linaje patogénico global y cepas nativas de Sudamérica. Si bien las especies exóticas de anfibios pueden haber contribuido al ingreso de cepas de *Bd* a la región, este hongo ha estado presente en anfibios neotropicales mucho antes de su introducción. La importancia de la quitridiomycosis en declinaciones poblacionales de anfibios de Brasil ya había sido cuestionada por de Brito-Gitirana *et al.* (2009), dado los numerosos registros de infección por *Bd* en una amplia región geográfica sin la observación de eventos de mortalidad como los ocurridos en otros continentes (ver Carnaval *et al.* 2006; Toledo *et al.* 2006; Toledo *et al.* 2006a). El origen Neotropical de *Bd* debe investigarse más a fondo ya que Talley *et al.* (2015) publican también el hallazgo de viejos casos de infección en anfibios de Norteamérica, el más lejano correspondiente a 1888, y recientemente Fong *et al.* (2015) reportan casos de infección en Corea del Norte en 1911. Otras posibles formas naturales de transmisión del patógeno, diferentes al mercado internacional de anfibios, también deben tenerse en cuenta (Lips 2014). La posiblemente larga coexistencia en Sudamérica de distintos linajes de *Bd* con una gran diversidad de hospedadores (Rodríguez *et al.* 2014), provee de un enorme campo para el estudio de los factores involucrados en la tolerancia al patógeno (Lips 2014).

En esta sección se aborda el estudio de algunos aspectos básicos de la infección por *Bd* en anfibios de Uruguay. El Capítulo 3 presenta un muestreo primario sobre este patógeno en especies nativas, con el hallazgo de nuevas localidades y hospedadores, y variación estacional de su prevalencia. En el Capítulo 4 se estudia la infección en especies introducidas, y en el Capítulo 5 se realiza una caracterización molecular de las cepas de *Bd* existentes en Uruguay.

# Referencias

- Alford, R.A., Bradfield, K.S & Richards, S.J. (2007) Global warming and amphibian losses. *Nature*, 447, E3-E4.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K. R., Marantelli, G., & Parkes, H. (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 95, 9031–9036.
- Berger, L., Speare, R. & Hyatt, A. (1999) Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. En: Campbell, A. (ed.) *Declines and Disappearances of Australian Frogs*, Environment Australia, Canberra, pp. 23–31.
- Berger, L., Speare, R. & Kent, A. (1999a) Diagnosis of chytridiomycosis of amphibians by histological examination. *Zoos Print Journal*, 15, 184–190.
- Berger, L., Speare, R., Hines, H.B., Marantelli, G., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Skerratt, L.F., Olsen, V., Clarke, J.M., Gillespie, G., Mahony, M., Sheppard, N., Williams, C. & Tyler, M.J. (2004) Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal*, 82(7), 434–439.
- Berger, L., Hyatt, A.D., Speare, R. & Longcore, J.E. (2005) Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68(1), 51–63.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I. García-París, M. (2001) Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*, 97, 331–337.
- Bradley, G.A., Rosen, P.C., Sredl, M.J., Jones, T.R. & Longcore, J.E. (2002) Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *Journal of Wildlife Diseases*, 38(1), 206–212.
- Carey, C. (1993) Hypothesis concerning the causes of the disappearance of Boreal Toads from the mountains of Colorado. *Conservation Biology*, 7(2), 355–362.
- Carnaval, A.C.O.Q., Puschendorf, R., Peixoto, O.L., Verdade, V.K. & Trefaut Rodriguez, M. (2006) Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic rainforest. *EcoHealth*, 3, 41–48.
- Carver, S., Bell, B.D. & Waldman, B. (2010) Does chytridiomycosis disrupt amphibian skin function? *Copeia*, 2010(3), 487–495.
- Chatfield, M.W.H. & Richards-Zawacki, C.L. (2011) Elevated temperature as a treatment for *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in captive frogs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94(3), 235–238.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E. & Speare, R. (1999) Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases*, 5(6), 735–748.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., & Hyatt, A.D. (2003) Infectious disease and amphibian population decline. *Diversity and Distributions*, 9(2), 141–150.
- Daszak, P., Strieby, A., Cunningham, A.A., Longcore, J.E., Brown, C.C. & Porter, D. (2004) Experimental evidence that the Bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal*, 14(4),

- 201–207.
- de Brito-Gitirana, L., Felseburgh, F.A., Carvalho e Silva, S.P. & de Almeida, P.G. (2009) Is the chytrid fungus really responsible for amphibian decline? *The Open Zoology Journal*, 2, 49–52.
- Di Rosa, I., Simoncelli, F., Fagotti, A. & Pascolini, R. (2007) The proximate cause of frog declines? *Nature*, 447, E4-E5.
- Duffus, A.L.J. (2009) Chytrid blinders: what other disease risks to amphibians are we missing? *EcoHealth*, 6, 335–339.
- Fisher, M.C. & Garner, T.W.J. (2007) The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, 21, 2–9.
- Fisher, M.C., Garner, T.W.J. & Walker, S.F. (2009) Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time and host. *Annual Reviews in Microbiology*, 63, 291–310.
- Fong, J.J., Cheng, T.L., Bataille, A., Pessier, A.P., Waldman, B. & Vredenburg, V.T. (2015) Early 1900s detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Korean amphibians. *PLoS ONE*, 10(3), e0115656.
- Forrest, M.J. & Schlaepfer, M.A. (2011) Nothing a hot bath won't cure: infection rates of amphibian chytrid fungus correlate negatively with water temperature under natural field settings. *PLoS ONE*, 6(12), e28444, 1–9.
- Garner, T.W.J., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham, A.A. & Fisher, M.C. (2006) The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, 2(3), 455–459.
- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Susuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T. & Hyatt, A. (2009) Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18, 4757–4774.
- Hanselmann, R., Rodríguez, A., Lampo, M., Fajardo-Ramos, L., Alonso Aguirre, A., Kilpatrick, A. M., Rodríguez, J.P. & Daszak, P. (2004) Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biological Conservation*, 120(1), 115–119.
- Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Olsen, V., Boyle, D.B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F. & Collong, A (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(3), 175–192.
- James, T.Y., Letcher, T.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E., Porter, D., Powell, M.J., Griffith, G.W. & Vilgalys, R. (2006) A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98(6), 860–871.
- James, T.Y., Litvintseva, A.P., Vilgalys, R., Morgan, J.A., Taylor, J.W., Fisher, M.C., Berger, L., Weldon, C., du Preez, L. & Longcore, J.E. (2009) Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. *PLoS Pathogens*, 5(5), 1–12.
- James, T.Y., Toledo, L.F., Rödder, D., da Silva Leite, D., Belasen, A.M., Betancourt-Román, C.M., Jenkinson, T.S., Lambertini, C., Longo, A.V., Ruggeri, J., Collins, J.P., Burrowes, P.A., Lips, K.R., Zamudio, K.R. & Longcore, J.E. (2015) Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife



- disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. *Ecology and Evolution*, 5(18), 4079–4097.
- Johnson, M.L. & Speare, R. (2005) Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65(3), 181–186.
- Johnson, M.L., Berger, L., Philips, L. & Speare, R. (2003) Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57(3), 255–260.
- Kilburn, V.L., Ibáñez, R. & Green, D.M. (2011) Reptiles as potential vectors and hosts of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panama. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97(2), 127–134.
- Knapp, R.A. & Morgan, J.A. T. (2006) Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. *Copeia*, 2006(2), 188–197.
- Kolby, J.E. (2014) Presence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in native amphibians exported from Madagascar. *PLoS ONE*, 9(3), e89660.
- Kolby, J.E., Ramirez, S.D., Berger, L., Richards-Hrdlicka, K.L., Jocque, M. & Skerratt, L.F. (2015) Terrestrial dispersal and potential environmental transmission of the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *PLoS ONE*, 10(4), e0125386.
- Kolby, J.E., Ramirez, S.D., Berger, L., Griffin, D.W., Jocque, M. & Skerratt, L.F. (2015a) Presence of amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in rainwater suggests aerial dispersal is possible. *Aerobiologia*, 31(3), 411–419.
- Kruger, K.M. (2009) Lack of evidence for the drought-linked chytridiomycosis hypothesis. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(2), 537–541.
- Kruger, K.M. & Hero, J.M. (2006) Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. *Journal of Zoology*, 271(3), 352–359.
- Kruger, K.M. & Hero, J.M. (2009) Chytridiomycosis, amphibian extinctions, and lessons for the prevention of future panzootics. *Ecohealth*, 6(1), 6–10.
- La Marca, E., Lips, K.R., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibáñez, R., Rueda-Almonacid, J.V., Schulte, R., Marty, C., Castro, F., Manzanilla-Puppo, J., García-Pérez, J.E., Bolaños, F., Chaves, G., Pounds, J.A., Toral, E. & Young, B.E. (2005) Catastrophic population declines and extinctions in neotropical Harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica*, 37(2), 190–201.
- Lips, K.R. (2014) A tale of two lineages: unexpected long-term persistence of the amphibian-killing fungus in Brazil. *Molecular Ecology*, 23, 747–749.
- Lips, K.R., Green, D.R. & Pappendick, R. (2003) Chytridiomycosis in wild frogs from southern Costa Rica. *Journal of Herpetology*, 37(1), 215–218.
- Lips, K.R., Mendelson III, J.R., Muñoz Alonso, A., Canseco-Márquez, L. & Mulcahy, D.G. (2004) Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation*, 119(4), 555–564.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A.P. & Collins, J.P. (2006) Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 103(9), 3165–3170.

- Lips, K.R., Diffendorfer, J., Mendelson III, J.R., Sears, M.W. (2008) Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian decline. *PLoS Biology*, 6, 441–454.
- Longcore, J.E., Pessier, A.P. & Nichols, D.K. (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov. a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219–227.
- Lötters, S., Kielgast, J., Bielby, J., Schmidlein, S., Bosch, J., Veith, M., Walker, S.F., Fisher, M.C. & Rödder, D. (2009) The link between rapid enigmatic amphibian decline and the globally emerging chytrid fungus. *EcoHealth*, 6(3), 358–372.
- Martel, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Blooi, M., Bert, W., Ducatelle, R., Fisher, M.C., Woeltjes, A., Bosman, W., Chiers, K., Bossuyt, F. & Pasmans, F. (2013) *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 110(38), 15325–15329.
- Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., Van Rooij, P., Beukema, W., Fisher, M.C., Farrer, R.A., Schmidt, B.R., Tobler, U., Goka, K., Lips, K.R., Muletz, C., Zamudio, K.R., Bosch, J., Lötters, S., Wombwell, E., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A., Spitzen-van der Sluijs, A., Salvidio, S., Ducatelle, R., Nishikawa, K., Nguyen, T.T., Kolby, J.E., Van Bocxlaer, I., Bossuyt, F. & Pasmans, F. (2014) Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science*, 346(6209), 630–631.
- McMahon, T.A., Brannelly, L.A., Chatfield, M.W.H., Johnson, P.T.J., Joseph, M.B., McKenzie, V.J., Richards-Zawacki, C.L., Venesky, M.D. & Rohr, J.R. (2013) Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* has nonamphibian hosts and releases chemicals that cause pathology in the absence of infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 110(1), 210–215.
- Mendelson III, J.R., Jones, M.E.B., Pessier, A.P., Toledo, G., Kabay, E.H. & Campbell, J.A. (2014) On the timing of an epidemic of amphibian chytridiomycosis in the highlands of Guatemala. *South American Journal of Herpetology*, 9(2), 151–153.
- Morell, V. (1999) Are pathogens felling frogs? *Science*, 284(5415), 728–731.
- Morgan, J.A.T., Vredenburg, V.T., Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., Sice, M.J., Tunstall, T., Bingham, R.E., Parker, J.M., Longcore, J.E., Moritz, C., Briggs, C.J. & Taylor, J.W. (2007) Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 104, 13845–13850.
- Muths, E., Corn, C.P., Pessier, A.P. & Green, D.E. (2003) Evidence of disease-related amphibian decline in Colorado. *Biological Conservation*, 110, 357–365.
- Mutschmann, F., Berger, L., Zwart, P. & Gaedicke, C. (2000) Chytridiomykose bei Amphibien - erstmaliger Nachweis für Europa. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 113, 380–383.
- Olson, D.H., Aanensen, D.M., Ronnenberg, K.L., Powell, C.I., Walker, S.F., Bielby, J., Garner, T.W.J., Weaver, G., The *Bd* Mapping Group & Fisher, M.C. (2013) Mapping the global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the amphibian chytrid fungus. *PLoS ONE*, 8(2), e56802.
- Pounds, J.A., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J.A., Fogden, M.P.L., Foster, P.N., La Marca, E., Masters, K.L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S.R., Sánchez-Azofeifa, G.A., Still, C.J. & Young, B.E. (2006) Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming.

- Nature*, 439, 161–167.
- Pounds, J.A., Bustamante, R., Coloma, R.A., Consuegra, L.A., Fogden, M.P.L., Foster, P.N., La Marca, E., Masters, K.L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R., Ron, S.R., Sánchez-Azofeifa, G.A., Still, C.J. & Young, B. E. (2007) Pounds *et al.* Reply. *Nature*, 447: E5-E6.
- Rachowicz, L.J. & Vredenburg, V.T. (2004) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1–2), 75–83.
- Rachowicz, L.J., Hero, J.M., Alford, R.A., Taylor, J.W., Morgan, J.A.T., Vredenburg, V.T., Collins, J.P., Briggs, C.J. (2005) The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conservation Biology*, 19(5), 1441–1448.
- Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., Morgan, J.A.T., Stice, M.J., Vredenburg, V.T., Parker, J.M. & Briggs, C.J. (2006) Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology*, 87(7), 1671–1683.
- Ribas, L., Li, M., Doddington, B.J., Robert, J., Seidel, J.A., Kroll, J.S., Zimmerman, L.B., Grassly, N.C., Garner, T.W.J. & Fisher, M.C. (2009). Expression profiling the temperature-dependent amphibian response to infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLoS ONE*, 4(12), e8408, 1–10.
- Rodriguez, D., Becker, C.G., Pupin, N.C., Haddad, C.F.B. & Zamudio, K.R. (2014) Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Molecular Ecology*, 23(4), 774–787.
- Ron, S.R. & Merino, A. (2000) Declinación de anfibios del Ecuador: información general y primer reporte de chytridiomycosis para Sudamérica. *Froglog*, 42, 2.
- Ryan, M.J., Lips, K.R. & Eichholz, M.W. (2008) Decline and extirpation of an endangered Panamanian stream frog population (*Craugastor punctarolius*) due to an outbreak of chytridiomycosis. *Biological Conservation*, 141, 1636–1647.
- Schloegel, L.M., Hero, J.M., Berger, L., Speare, R., McDonald, K. & Daszak, P. (2006) The decline of the Sharp-snouted day frog (*Taudactylus acutirostris*): the first documented case of extinction by infection in a free-ranging wildlife species? *EcoHealth*, 3(1), 35–40.
- Schloegel, L.M., Picco, A.M., Kilpatrick, A.M., Davies, A.J., Hyatt, A.D. & Daszak, P. (2009) Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biological Conservation*, 142(7), 1420–1426.
- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K.R., Phillott, A.D., Hines, H.B. & Kenyon, N. (2007) Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, 4(2), 125–134.
- Symonds, E.P., Hines, H.B., Bird, P.S., Morton, J.M. & Mills, P.C. (2007) Surveillance for *Batrachochytrium dendrobatidis* using *Mixophyes* (Anura: Myobatrachidae) larvae. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(1), 48–60.
- Talley, B.L., Muletz, C.R., Vredenburg, V.T., Fleischer, R.C. & Lips, K.R. (2015) A century of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Illinois amphibians (1889–1989). *Biological Conservation*, 182, 254–261.
- Todd-Thompson, M., Miller, D.L., Super, P.E. & Gray, M.J. (2009) Chytridiomycosis-associated mortality in a *Rana palustris* collected in Great Smoky Mountains National Park, Tennessee, USA. *Herpetological Review*, 40(3), 321–323.
- Toledo, L.F., Britto, F.B., Araújo, O.G.S., Giasson,

- L.M.O. & Haddad, C.F.B. (2006) The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. *South American Journal of Herpetology*, 1(3), 185–191.
- Toledo, L.F., Haddad, C.F.B., Carnaval, A.C.O.Q. & Britto, F.B. (2006a) A Brazilian anuran (*Hylodes magalhaesi*: Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a conservation concern. *Amphibian and Reptile Conservation*, 4(1), 17–21.
- Van Rooij, P., Martel, A., D’Herde, K., Brutyn, M., Croubels, S., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. & Pasmans, F. (2012) Germ tube mediated invasion of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian skin is host dependent. *PLoS ONE*, 7(7), e41481, 1–8.
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R. & Skerratt, L.F. (2007) Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77(2), 113–118.
- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W.F. & Dinudom, A., Cook, D., Webb, R., Alford, R.A., Skerratt, L.F. & Speare, R. (2009) Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, 326(5952), 582–585.
- Voyles, J., Vredenburg, V.T., Tunstall, T.S., Parker, J.M., Briggs, C.J. & Rosenblum, E.B. (2012) Pathophysiology in Mountain yellow-legged Frogs (*Rana muscosa*) during a chytridiomycosis outbreak. *PLOS ONE*, 7(4), e35374, 1–6.
- Vredenburg, V.T., Knapp, R.A., Tunstall, T.S. & Briggs, C.J. (2010) Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 107(21), 9689–9694.
- Waldman, B., van de Wolfshaar, K.E., Klena, J.D., Andjic, V., Bishop, P.J. & Norman, R.J. de B. (2001) Chytridiomycosis in New Zealand frogs. *Surveillance*, 28(3), 9–11.
- Weldon, C., du Preez, L.H., Hyatt, A.D., Muller, R. & Speare, R. (2004) Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2100–2105.
- Whitfield, S.M., Bell, K.E., Philippi, T., Sasa, M., Bolaños, F., Chaves, G., Savage, J.M. & Donnelly, M.A. (2005) Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 104(20), 8352–8356.
- Woodhams, D.C., Alford, R.A. & Marantelli, G. (2003) Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55(1), 65–67.



## Quitridiomycosis en anfibios nativos

### Resumen

Se presenta en esta sección un muestreo sobre la ocurrencia de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) en especies de anfibios nativos de Uruguay. Este patógeno se detectó en numerosas localidades del centro-sur y este del país, en distintos tipos de ambientes, en los anuros *Dendropsophus sanborni*, *Hypsiboas pulchellus*, *Julianus uruguayus*, *Leptodactylus latrans*, *Limnomedusa macroglossa*, *Melanophryniscus sanmartini*, *Odontophrynus americanus*, *Physalaemus henselii*, *Pleurodema bibroni*, *Pseudis minutus*, *Rhinella arenarum* y *Scinax squalirostris*. En las especies mejor representadas la frecuencia de infección fue alta, entre 10 y 88 %. Ésta presentó una marcada estacionalidad en *H. pulchellus*, con valores más altos en invierno y primavera temprana, siendo más baja en otoño y primavera avanzada, no detectándose en verano. Los resultados sugieren que *Bd* se encuentra en equilibrio con los hospedadores, y su presencia no se asoció a episodios espontáneos de morbilidad o mortalidad masiva en poblaciones silvestres. Sin embargo, tres ejemplares de *L. macroglossa* positivos a *Bd* evidenciaron síntomas de quitridiomycosis clínica en el laboratorio, muriendo poco después.

## Introducción

En la región centro-este de Sudamérica, la quitridiomycosis debida a *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) se ha considerado como una de las causas de extinción poblacional en anfibios andinos del género *Telmatobius* (Barrionuevo & Mangione 2006). En otras regiones templadas del continente, la relación de esta enfermedad con declinaciones de anfibios no es evidente. En Uruguay, numerosas especies nativas se consideran en delicado estado de conservación, y al igual que en muchas otras regiones, la destrucción de hábitat es una de las principales amenazas (Maneyro & Langone 2001; Langone *et al.* 2004; Stuart *et al.* 2008; Kolenc *et al.* 2009). Sin embargo, el conocimiento sobre aspectos básicos de la biología de la mayoría de las especies nativas es aún incipiente, y el único estudio de caso sobre declinación poblacional es el realizado sobre *Pleurodema bibroni*. Este anuro ha sufrido una significativa retracción de su rango de distribución en Uruguay, al parecer de naturaleza multifactorial (Kolenc *et al.* 2009). Otras especies de anfibios nativos presentan un patrón de declinación similar en el sur del país, como es el caso de *Ceratophrys ornata*, *Melanophryniscus montevidensis* y *Physalaemus henselii*, entre otros (Kolenc *et al.* 2009; ver Apéndice 3).

La relación de estos episodios de declinación poblacional en anuros nativos de Uruguay con la quitridiomycosis no es clara (Borteiro *et al.* 2009; Kolenc *et al.* 2009). Esta micosis fue detectada por primera vez en el país en criaderos de Rana toro norteamericana (Mazzoni *et al.* 2003; Garner *et al.* 2006). Poco después la infección por *Bd* fue identificada en ejemplares de especies nativas en estado silvestre provenientes del norte y varias localidades costeras (Borteiro *et al.* 2009; Bardier *et al.* 2011).

En este Capítulo se investiga la presencia actual e histórica de infección por *Bd* en especies nativas de Uruguay, con énfasis en las especies en declinación *Physalaemus henselii* y *Pleurodema bibroni*. Se reportan nuevos hospedadores de *Bd* y datos sobre prevalencia, estacionalidad y distribución geográfica.

# Objetivos

## Objetivo general

Estudiar aspectos epidemiológicos básicos sobre la infección por *Bd* en anfibios nativos.

## Objetivos específicos

- 1) Investigar la presencia de *Bd* en anfibios nativos, principalmente en hábitats costeros y serranías, con énfasis en especies en declinación.
- 2) Obtener estimaciones primarias de la prevalencia de *Bd* en anfibios nativos.
- 3) Estudiar el comportamiento estacional de la infección.
- 4) Analizar retrospectivamente la infección por *Bd* en especies que han sufrido declinaciones poblacionales.

# Materiales y métodos

## Sitios de estudio, especies y muestreo

Los estudios se realizaron principalmente sobre ejemplares de anuros postmetamórficos pertenecientes a 14 especies ( $n = 129$ ), colectados en numerosas localidades principalmente del sur y este de Uruguay. Se estudiaron también dos lotes de larvas de *Hypsiboas pulchellus* ( $n = 8$ ). En muestras con  $n \geq 10$  se calculó el IC de la prevalencia de infección por *Bd* a un nivel del 95 % utilizando el método de Wilson (Wilson 1927; Newcombe 1998). Para estudiar la variación estacional de la infección se estudió la especie *Hypsiboas pulchellus*, que puede encontrarse durante todo el año. A estos efectos se pudieron realizar seis muestreos en los alrededores de La Paloma y Laguna de Rocha, Dpto. de Rocha, entre setiembre de 2012 y



abril de 2014, período en el cual no se registraron fenómenos climáticos excepcionales. Se capturaron 137 ejemplares adultos, principalmente machos que se encontraban vocalizando en cuerpos de agua utilizados para la reproducción. Las prevalencias se compararon mediante el test exacto de Fisher para pequeñas muestras; en algunas muestras de las más numerosas la frecuencia de infección fue baja ( $< 5$ ) como para utilizar la prueba de Chi cuadrado (Siegel 1956). Se consideró un nivel de significación de 0,05 para rechazar la hipótesis nula de que la prevalencia en las distintas estaciones no difiere. Para los análisis se utilizó el programa STATISTICA 6.0<sup>®</sup>.

Los acrónimos de los ejemplares utilizados corresponden a los indicados en el Capítulo 2, y los ejemplares estudiados y sus respectivas localidades se listan en el Apéndice 2.

## Diagnóstico molecular

Toma de muestras. La mayoría de las muestras utilizadas fueron hisopados de piel realizados con hisopos comerciales de mango de polietileno y cabeza de polivinilo Puritan<sup>®</sup> ( $n = 288$ ). Los hisopos se frotaron en cada ejemplar 5 veces sobre la superficie ventral del cuerpo, manos y miembros, y en las larvas 5 veces sobre el disco oral. En algunos casos se utilizaron pequeños trozos de disco oral de aproximadamente  $1 \text{ mm}^3$ , obtenidos mediante disección bajo lupa binocular, inmediatamente después de practicada la eutanasia. Las muestras se rotularon con un número de campo precedido del acrónimo BKT. La conservación de las muestras y extracciones de ADN se detallan en el Capítulo 2. La concentración de los extractos de ADN fue medida en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000<sup>®</sup>, teniendo en cuenta la relación de absorbancias 280/260 nm para evaluar la calidad de los mismos.

PCR. El protocolo se realizó de acuerdo a lo descrito por Annis *et al.* (2004) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a  $93 \text{ °C}$  10 min, 30 ciclos de  $93 \text{ °C}$  45 s,  $61 \text{ °C}$  45 s y  $72 \text{ °C}$  1 min, con una extensión final de  $72 \text{ °C}$  10 min. Se utilizaron los cebadores sugeridos por dichos autores, Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3') y Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'), que permiten amplificar un fragmento del gen 18S RNA de aproximadamente 300 pares de bases (pb), específico de *Bd*. Se trabajó con  $10 \text{ } \mu\text{l}$  de muestra conteniendo aproximadamente 10 ng de ADN (Annis *et al.* 2004), en un volumen de reacción de  $25 \text{ } \mu\text{l}$ . Algunas muestras de tejidos que presentaron concentraciones de ADN

relativamente altas fueron diluidas con agua purificada en sistemas Milli-Q<sup>®</sup>. Los productos de amplificación por PCR fueron analizados en geles de poliacrilamida 12 %.

Control negativo. Se utilizaron dos controles negativos, uno de ellos consistió en ADN del anuro *Melanophryniscus montevidensis* (MNHN 9522) extraído de tejido hepático, dado que los hisopados incorporan a la reacción de PCR ADN de anfibio. Este control se utilizó en varias reacciones de PCR previas al procesamiento de muestras de campo, siendo los resultados consistentemente negativos. El otro control negativo fue un control absoluto en el que la muestra de ADN se sustituyó por agua purificada en sistemas Milli-Q<sup>®</sup>, tratada adicionalmente con radiación UV, incluido en todas las rutinas de diagnóstico.

Control positivo. El control positivo fue ADN de una muestra de la cepa de *Bd* JEL423, obtenida a partir de un cultivo puro y fijada en alcohol 95 % v/v (gentileza de Joyce E. Longcore, School of Biology & Ecology, University of Maine, Orono, Maine). El mismo fue incluido en todas las rutinas de PCR.

Control mediante secuenciación. Algunos productos de amplificación que produjeron el fragmento esperado de aproximadamente 300 pb (Annis *et al.* 2004), fueron purificados según se indica en el Capítulo 2, y secuenciados en secuenciadores del Institut Pasteur de Montevideo. La identidad de las secuencias obtenidas se investigó en la base de datos de GenBank mediante búsquedas con algoritmos BLAST.

Sensibilidad. La sensibilidad del PCR se estudió con diluciones seriadas del control positivo (cepa JEL423). Partiendo de una solución de 1 ng/μl de ADN se realizaron tres diluciones, 1/100, 1/1000 y 1/10000, logrando concentraciones de 10, 0,1 y 0,001 pg/μl de respectivamente. Cantidades variables de estas diluciones se analizaron por triplicado en reacciones de PCR, incorporando entre 0,001 y 100 pg de ADN molde en un volumen total de muestra de 10 μl. El límite inferior de detección alcanzado fueron 10 pg de ADN, lo cual está de acuerdo a lo descrito para la técnica utilizada (Annis *et al.* 2004), ver tabla 3.1.

**TABLA 3.1.** Sensibilidad de la técnica de PCR utilizando muestras con cantidades variables de ADN molde de *Bd* (cepa JEL423).

Dilución de la solución 1 ng/μl	Volumen utilizado (μl)	H <sub>2</sub> O adicional (c.s.p. 10 μl)	Cantidad de ADN (pg)	Resultado		
1/10000	1	9	0,001	-	-	-
	2	8	0,002	-	-	-
	5	5	0,005	-	-	-
	10	0	0,01	-	-	-
1/1000	1	9	0,1	-	-	-
	2	8	0,2	-	-	-
	5	5	0,5	-	-	-
	10	0	1	-	-	-
1/100	1	9	10	-	+	+
	2	8	20	+	+	+
	5	5	50	+	+	+
	10	0	100	-	+	+

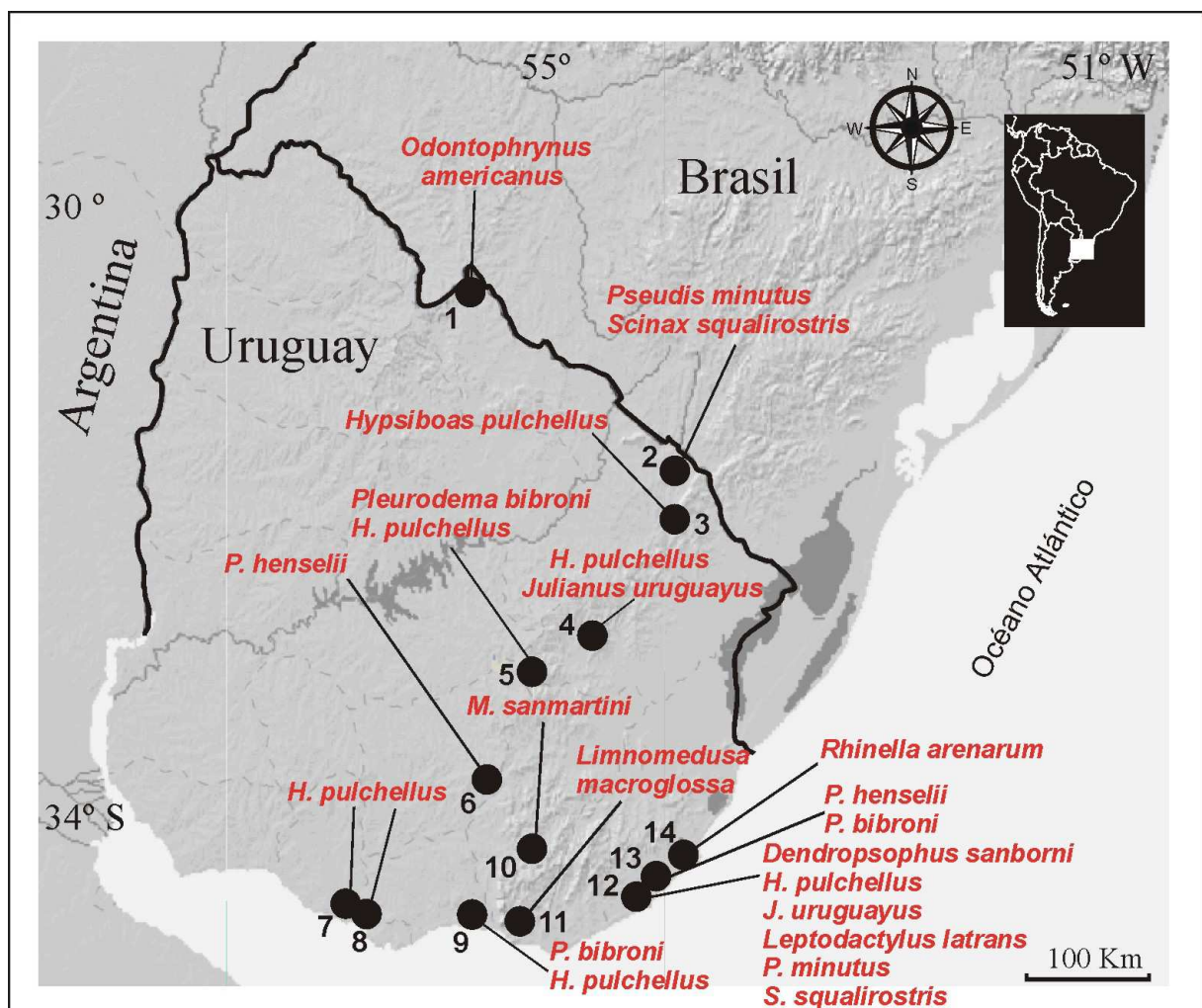
## Diagnóstico histológico

Se utilizaron muestras de piel de anfibios adultos y de disco oral de larvas, que fueron procesadas para análisis histológicos de rutina. En adultos se utilizaron muestras de piel ventral (parche pélvico), donde hay mayores probabilidades de detectar la infección por *Bd* (Berger *et al.* 2005). En ejemplares de colecciones utilizados para el estudio retrospectivo que ya presentaban disecciones, las muestras se tomaron en la piel contigua a éstas y cerca del parche pélvico, para no causar más daño. Las preparaciones fueron analizadas y fotografiadas a 1000X en el microscopio óptico. La eficiencia del diagnóstico histológico se evaluó en muestras de parche pélvico de *Physalaemus henselii* y *Pleurodema bibroni*, ya que la mayoría de los ejemplares del estudio retrospectivo correspondieron a estas especies; se utilizaron 10 ejemplares de ambas positivos al PCR, preparándose 2 o 3 láminas por ejemplar conteniendo en promedio 17 cortes de piel de 0,8 a 4,6 mm ( $\bar{x} = 2,6$ ; DS 0,8). Para evitar casos dudosos se consideró como diagnóstica la presencia de esporangios esporulados. Para cuantificar la presencia de esporangios de *Bd*, las preparaciones histológicas se fotografiaron bajo lupa binocular y la longitud de los cortes de piel fue medida sobre imágenes utilizando el programa Image J 1.45<sup>®</sup>. Los detalles de los procedimientos se indican en el Capítulo 2.

## Resultados

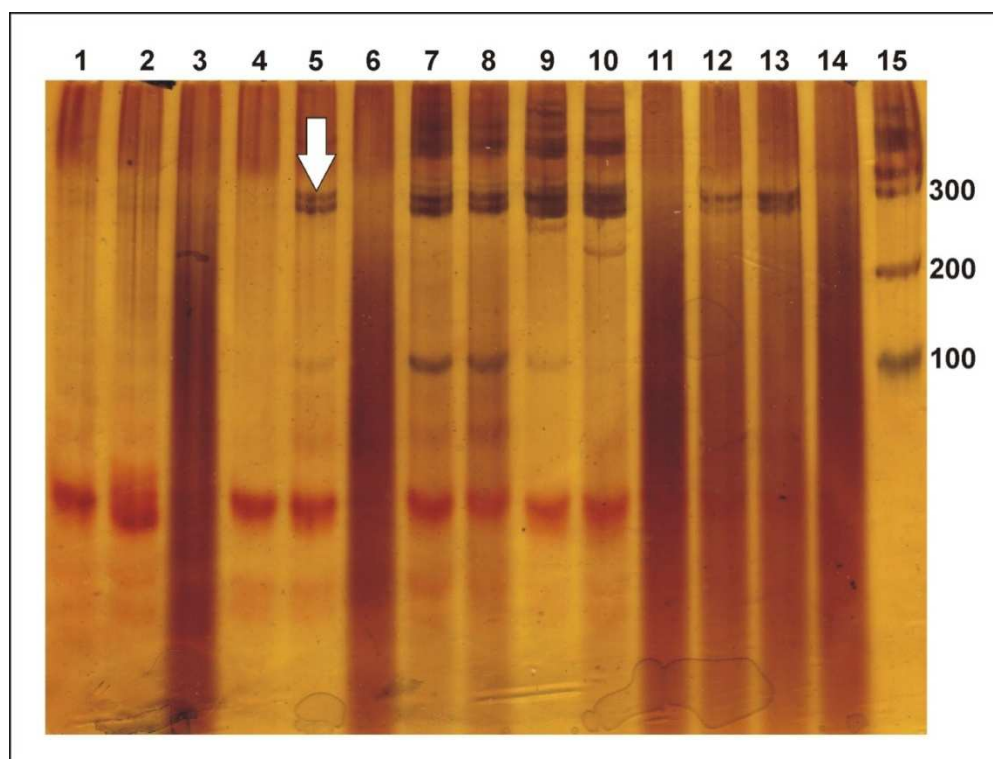
### Distribución geográfica, hospedadores, hábitat y prevalencia

En la mayoría de las localidades se realizaron diagnósticos positivos, en ejemplares de *Dendropsophus sanborni*, *Hypsiboas pulchellus*, *Julianus uruguayus*, *Pseudis minutus*, *Scinax squalirostris* (Hylidae), *Leptodactylus latrans* (Leptodactylidae), *Limnomedusa macroglossa* (Alsodidae), *Melanophryniscus sanmartini*, *Rhinella arenarum* (Bufonidae), *Physalaemus henselii* y *Pleurodema bibroni* (Leptodactylidae), figura 3.1.



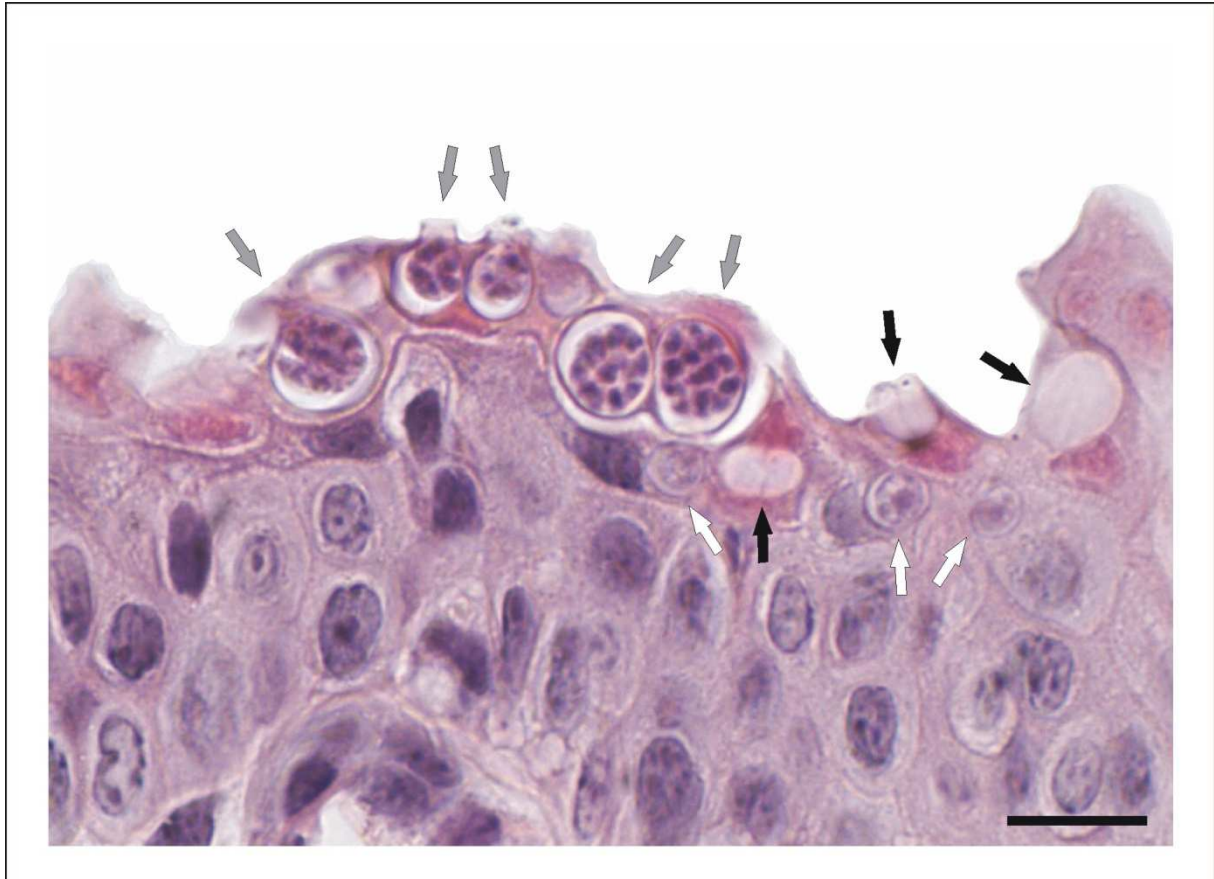
**FIGURA 3.1.** Distribución geográfica de los diagnósticos de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* realizados en anfibios nativos. Localidades: 1, Pueblo Madera; 2, Aceguá; 3, Río Tacuarí; 4, Quebrada de los Cuervos; 5, Valentines; 6, Ruta 7 km 139; 7, Libertad; 8, Delta del Tigre; 9, Jaureguiberry; 10, Salto del Penitente; 11, Sierra de las Ánimas; 12, La Paloma/Laguna de Rocha; 13, Oceanía del Polonio; 14, Barra de Valizas.

Las reacciones de PCR positivas amplificaron fragmentos de unas 300 y 330 pb, de acuerdo a lo descrito para la técnica (Annis *et al.* 2004), figura 3.2. La frecuencia de infección en hisopados de piel de adultos analizados mediante PCR fue alta, 38,6 % (102/264). Las especies mejor representadas en el muestreo fueron *Hypsiboas pulchellus* (n = 147), *Physalaemus henselii* (n = 30), *Pleurodema bibroni* (n = 47) y *Julianus uruguayus* (n = 25). En *H. pulchellus* se detectó la infección en la mayoría de las poblaciones, tanto de ambientes serranos como costeros. La frecuencia de infección en la muestra total de esta especie fue 38,8 % (57/147).



**FIGURA 3.2.** Diagnósticos de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios nativos. Se muestra una corrida electroforética de productos de PCR en gel de poliacrilamida. Carriles, 1–3, *Limnomedusa macroglossa* BKT 2727 juvenil, 2765 ♀ y 3480 ♂, negativos (-); 4, 5, *Odontophrynus americanus* BKT 2745 ♂ (-), BKT 2746 ♂, positivo (+); 6, *Odontophrynus maisuma* BKT 425 metamorfo (-); 7, 8, *Rhinella arenarum* BKT 656\_1 metamorfos (+), 656\_2 (+); 9, control positivo (cepa JEL423); 10, *Lithobates catesbeianus* de criadero BKT 3086, larva (+); 11–14, *Hypsiboas pulchellus* BKT 3087\_1–4, larvas (3087\_2 y 3 +); 15, marcador de tamaños (pares de bases). La flecha señala la amplificación de dos fragmentos, de aproximadamente 300 y 330 pb (ver texto).

Los diagnósticos positivos realizados en *Physalaemus henselii* correspondieron a poblaciones remanentes en serranías del centro-este y la costa atlántica, la frecuencia de infección en la muestra total de esta especie fue 33,3 % (10/30). El diagnóstico histológico en un ejemplar positivo al PCR se muestra en la figura 3.3. No se evaluaron diferencias en la prevalencia por sexos dado el bajo número de hembras estudiado.

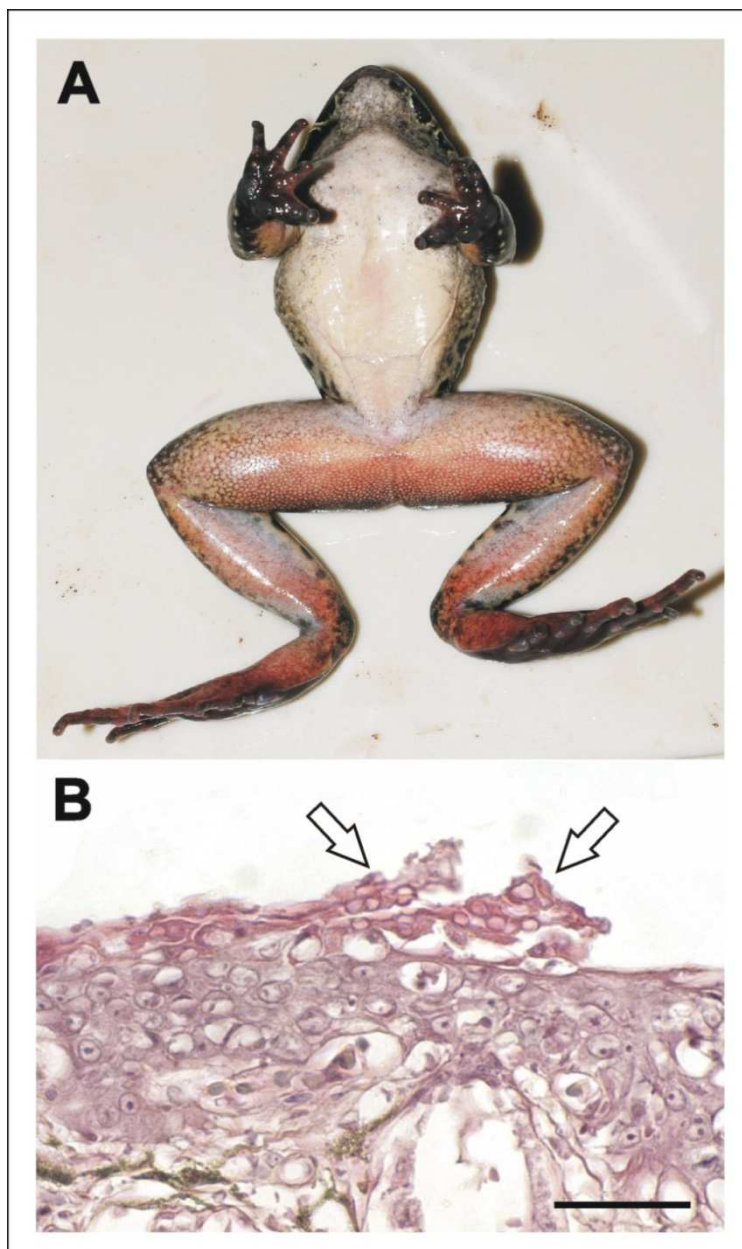


**FIGURA 3.3.** Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Physalaemus henselii*, cercanías de Cerro Colorado, Dpto. de Florida, Uruguay (5/IX/2009). Se observan esporangios maduros repletos de esporas y con tubos de descarga (flechas grises), esporangios inmaduros de menor tamaño (flechas blancas), y esporangios vacíos con septos característicos (flechas negras). Barra = 20  $\mu$ m.

Para *Pleurodema bibroni* se obtuvieron muestras positivas de las poblaciones muestreadas en Valentines, Jaureguiberry y Oceanía del Polonio, siendo la frecuencia de infección de 53,2 % (25/47). Las dos poblaciones de *Julianus uruguayus* en serranías de la Quebrada de los Cuervos y La Paloma sobre la costa atlántica fueron positivas. En esta última localidad, también fueron positivos hisopados de *Dendropsophus sanborni*, *Leptodactylus*

*latrans* y *Pseudis minutus*. En serranías, la infección por *Bd* se detectó también en larvas de *P. minutus* y *Scinax squalirostris* (Aceguá), y en adultos de *Odontophrynus americanus*, *Melanophryniscus sanmartini* y *Limnomedusa macroglossa*. En la tabla 3.2 se resumen todos los resultados obtenidos.

Los tres ejemplares de *Limnomedusa macroglossa* positivos fueron afectados por la quitridiomycosis. Estando en apariencia sanos, con buen estado corporal y comportamiento normal, murieron súbitamente pocos días después de estar en el laboratorio. Presentaron eritema de piel en zonas ventrales, principalmente en miembros posteriores. Los cortes histológicos de piel ventral evidenciaron infección intensa por *Bd*, ver figura 3.4.



**FIGURA 3.4.** Quitridiomycosis en un ejemplar adulto de *Limnomedusa macroglossa* de Sierra de las Ánimas, Dpto. de Maldonado, Uruguay (11/IX/2005). **A**, vista ventral de ejemplar adulto muerto en cautiverio, nótese el eritema, principalmente en miembros posteriores. Foto: Francisco Kolenc. **B**, corte histológico de parche pélvico. Se observa esfacelación de la epidermis superficial y numerosos esporangios de *Batrachochytrium dendrobatidis* (flechas), tinción H&E. Barra = 50  $\mu$ m.

**TABLA 3.2.** Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios nativos. Los diagnósticos corresponden a PCR de hisopados, salvo indicación. Para muestras con  $n \geq 10$  se indica IC 95 %.

Especie	Localidad	Fecha	Ambiente	Espécimen/número de la muestra (diagnóstico)	Positivos/n % (IC)	
<i>Dendropsophus sanborni</i>	La Paloma, Dpto. de Rocha	9/XI/2013	Charco temporal	BKT 3691 ♂	1/1	
	Valentines, Dpto. de Treinta y Tres	5/VII/2009	Charco temporal	MNHN 9477 ♂ (histología)	1/1	
	Delta del Tigre, Dpto. de San José	8/X/2010	Charco temporal	BKT 3084, larvas (PCR disco oral)	1/4	
	Libertad, Dpto. de San José	27/X/2010	Laguna artificial permanente	BKT 3087, larvas (PCR disco oral)	2/4	
	<i>Hypsiboas pulchellus*</i>	Sierra del Tigre, Dpto. de Treinta y Tres	10/VI/2011	Charco temporal	BKT 3267 ♂	0/1
		La Paloma, Dpto. de Rocha	11/VIII/2011	Laguna permanente	MNHN 9478 ♂ (histología)	1/1
		Aceguá, Dpto. de Cerro Largo	9/XI/2011	Tajamar permanente	BKT 3371 ♀	0/1
		Jaureguiberry, Dpto. de Canelones	16/VI/2012	Laguna semipermanente	BKT 3449, 3450 ♂♂	1/2
		Río Tacuarí, Dpto. de Cerro Largo	23/VIII/2012	Charco temporal	MNHN 9479/BKT 3481, 3483 ♂♂ (histología/PCR)	2/3
Quebrada de los Cuervos, Dpto. de Treinta y Tres	9/X/2012	Charco temporal	BKT 3513–3515 ♂♂	3/3		
<i>Julianus uruguayus</i>	Quebrada de los Cuervos, Dpto. de Treinta y Tres	6/IX/2009	Charco temporal	BKT 2772–2776, 2778–2795 ♂♂	4/23 17 (7–40)	
	La Paloma, Dpto. de Rocha	9/XI/2013	Charco temporal	BKT 3689 ♀, 3690 ♂	2/2	
<i>Leptodactylus latrans</i>	Laguna de Rocha, Dpto. de Rocha	17/IV/2013	Tajamar permanente	BKT 3576 ♂	1/1	
	Sierra de las Ánimas, Dpto. de Maldonado	11/IX/2005	Bajo piedras	BKT 260–262, sexo indeterminado (histología)	3/3	
<i>Limnomedusa macroglossa</i>	Cuchilla de Mangrullo, Dpto. de Cerro Largo	6/VII/2009		BKT 2727 juvenil	0/1	
	Lago Andresito, Dpto. de Soriano	13/VIII/2009		BKT 2765 hembra (PCR piel)	0/1	
	Río Tacuarí, Dpto. de Cerro Largo	23/VIII/2012	Pajonal	BKT 3480 macho	0/1	
<i>Melanophryniscus sanmartini</i>	Salto del Penitente, Dpto. de Lavalleja	29/VI/2009	Charco temporal	BKT 2709–2713 ♂♂	3/5	
<i>Odontophrynus americanus</i>	Curticeras, Dpto. de Rivera	7/VII/2009	Charco temporal	BKT 2745, 2746 ♂♂	1/2	

\* Se excluyen ejemplares utilizados para estudiar variación estacional de la infección en La Paloma/Laguna de Rocha.



**TABLA 3.2.** Continuación.

<i>Odontophrynus maisuma</i>	Cabo Polonio, Dpto. de Rocha	14/XI/2004	Charco temporal	BKT 425 metamorfo (PCR piel)	0/1
	Ruta 10, km 253, Dpto. de Rocha	21/VI/2009	Charco temporal	BKT 2680 ♂	0/1
<i>Physalaemus henselii</i>	Ruta 10, km 255, Oceanía del Polonio, Dpto. de Rocha	20–21/VI/2009	Charco temporal	BKT 2654–2656 ♂♂, 2657 ♀, 2658 ♂, 2670 ♂, 2674 ♂, 2675 ♀, 2681 ♀, 2682–2684 ♂♂, 2686 ♂, 2687 ♀	8/15 53 (30–75)
	Ruta 5, km 463, Dpto. de Rivera	7/VII/2009	Charco temporal	BKT 2718–2719 ♂♂	0/2
	Sierra del Tigre, Dpto. de Treinta y Tres	5/IX/2009	Charco temporal	BKT 2797 ♂	0/1
	Ruta 7, km 138, Dpto. de Florida	15/VI/2012	Charco temporal	BKT 3439 ♂	0/1
	Ruta 7, km 139 (3 km S de Cerro Colorado), Dpto. de Florida	5/VII/2009	Charco temporal	BKT 2721 ♂	1/1
		10/VI/2011	Charco temporal	BKT 3268 ♂	1/1
		15/VI/2012	Charco temporal	BKT 3438, 3440 ♂♂	0/2
	Ruta 7, km 154 (12 km N Cerro Colorado), Dpto. de Florida	5/VII/2009	Charco temporal	BKT 2720 ♂	0/1
		10/VI/2011	Charco temporal	BKT 3270 ♀	0/1
		15/VI/2012	Charco temporal	BKT 3435–3437 ♂♂	0/3
Sierra del Tigre, Dpto. de Treinta y Tres	10/VI/2011	Charco temporal	BKT 3269 ♂	0/1	
Valentines, Dpto. de Treinta y Tres	5/VII/2009	Charco temporal	BKT 2729–2730 ♂♂	2/2	
	15/VI/2012	Charco temporal	BKT 3434 ♂	1/1	
<i>Pleurodema bibroni</i>	Ruta 10, km 255, Oceanía del Polonio, Dpto. de Rocha	20–21/VI/2009	Charco temporal	BKT 2666 ♂, 2671–2672 ♂♂, 2676–2679 ♂♂, 2699 ♂, 2700 ♀, 2701 ♂, 2702 ♂, 2703 ♀, 2704 ♂, 2705 ♂, 2706–2708 ♀♀	15/17 88 (66–97)
	Jaureguiberry, Dpto. de Canelones	20/VI/2011	Charco semipermanente	BKT 3278 ♂, 3280 ♂, 3281 ♂, 3283 ♂, 3286–3290 ♂♂, 3530 ♂	1/10 10 (2–40)
		16/VI/2012	Charco semipermanente	BKT 3446 ♀, 3447 ♂, 3465 ♂♂ (n = 15)	6/17 35 (17–59)
<i>Pseudis minutus</i>	La Paloma, Dpto. de Rocha	11/IV/2014	Charco temporal	BKT 3802–3804 ♂♂	2/3
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	La Paloma, Dpto. de Rocha	9/XI/2013	Charco temporal	BKT 3692 ♀, 3693 ♂	0/2
	Villa del Cerro, Dpto. de Montevideo	7/X/2013	Vivienda humana	BKT 3655 ♀	0/1
<i>Rhinella arenarum</i>	Barra de Valizas, Dpto. de Rocha	8/I/2006	Peridomiciliario	BKT 656 metamorfos (PCR piel)	2/2
<i>Scinax granulatus</i>	Río Tacuarí, Dpto. de Cerro Largo	23/VIII/2012	Charco temporal	BKT 3490 ♂	0/1
<i>Scinax squalirostris</i>	La Paloma, Dpto. de Rocha	2/VIII/2013	Charco temporal	BKT 3610 ♂	1/1

## Comparación PCR - histología

La eficiencia de la técnica histológica como método de diagnóstico fue alta ya que resultaron positivos el 75 % de los ejemplares analizados (15/20). En promedio se requirió de 2 cortes histológicos para detectar la infección en un ejemplar dado, y el 45 % de todos los cortes fueron positivos (156/346). Los resultados se resumen en la tabla 3.3. Teniendo en cuenta la prevalencia observada ( $P = 0,45$ ), el número de muestra mínimo estimado para detectar *Bd* a un nivel de confianza del 90 y 95 %, es de 4 y 6 cortes histológicos respectivamente.

**TABLA 3.3.** Diagnóstico histológico de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en ejemplares de *Physalaemus henselii* (*Ph*) y *Pleurodema bibroni* (*Plb*) positivos al PCR. EE, esporangios esporulados.

Especie	Muestra	Láminas (mm piel)	Diagnóstico	cortes + / total (%)	Primer corte + <sup>1</sup>	mm piel corte + <sup>2</sup>	EE total	EE/corte <sup>3</sup>	EE/mm <sup>4</sup>
<i>Ph</i>	BKT 2654	2 (51,3)	+	9/22 (40,9)	1	2,4	16	0,7	0,3
	BKT 2656	2 (16,1)	-	0/7 (0)	-----	-----	-----	-----	-----
	BKT 2670	3 (29,8)	+	11/11 (100)	1	2,9	79	7,2	2,7
	BKT 2674	2 (33,9)	+	11/22 (50,0)	1	1,4	3	0,1	0,1
	BKT 2683	2 (45,6)	-	0/25 (0)	-----	-----	-----	-----	-----
	BKT 2684	2 (52,5)	+	13/23 (56,5)	1	1,9	26	1,2	0,5
	BKT 2685	3 (73,1)	+	13/24 (54,2)	3	9,0	35	1,5	0,5
	BKT 2686	2 (57,7)	-	0/24 (0)	-----	-----	-----	-----	-----
	BKT 2721	3 (24,8)	+	11/11 (100)	1	2,3	447	40,6	18,0
	BKT 3268	2 (39,2)	+	19/25 (76,0)	1	2,2	96	3,8	2,4
N = 10	24 (424)	7/10 (0,70)	87/193 (45,1)	$\bar{x} = 1,3$	$\bar{x} = 3,2$	-----	-----	$\bar{x} = 2,3$	
<i>Plb</i>	BKT 2666	2 (85,8)	+	19/24 (79,2)	2	8,1	79	3,3	0,9
	BKT 2671	3 (39,2)	+	1/10 (10,0)	6	22,3	4	0,4	0,1
	BKT 2672	3 (39,1)	+	10/10 (100)	2	6,9	37	3,7	0,9
	BKT 2676	2 (56,6)	+	7/21 (33,3)	1	2,8	19	0,8	0,3
	BKT 2677	3 (40,1)	-	0/12 (0)	-----	-----	-----	-----	-----
	BKT 2679	3 (32,2)	+	8/12 (66,7)	1	2,7	10	0,8	0,3
	BKT 2699	3 (37,4)	+	3/10 (33,3)	4	14,0	3	0,3	0,1
	BKT 2700	2 (68,8)	+	9/29 (31,0)	4	9,7	22	0,8	0,3
	BKT 2703	3 (39,5)	+	12/12 (100)	1	3,2	215	17,9	5,4
	BKT 2707	3 (39,8)	-	0/11 (0)	-----	-----	-----	-----	-----
N = 10	27 (478,5)	8/10 (0,80)	69/151 (45,7)	$\bar{x} = 2,6$	$\bar{x} = 8,7$	-----	-----	$\bar{x} = 1,0$	
TOTAL	N = 20 (902,5)	51	15/20 (0,75) IC (95 %) = 0,51–0,91	156/344 (45,3)	$\bar{x} = 2$	$\bar{x} = 6,1$	-----	-----	$\bar{x} = 0,8$

<sup>1</sup> Se refiere al número de cortes histológicos analizados al momento de detectar el primer esporangio esporulado.

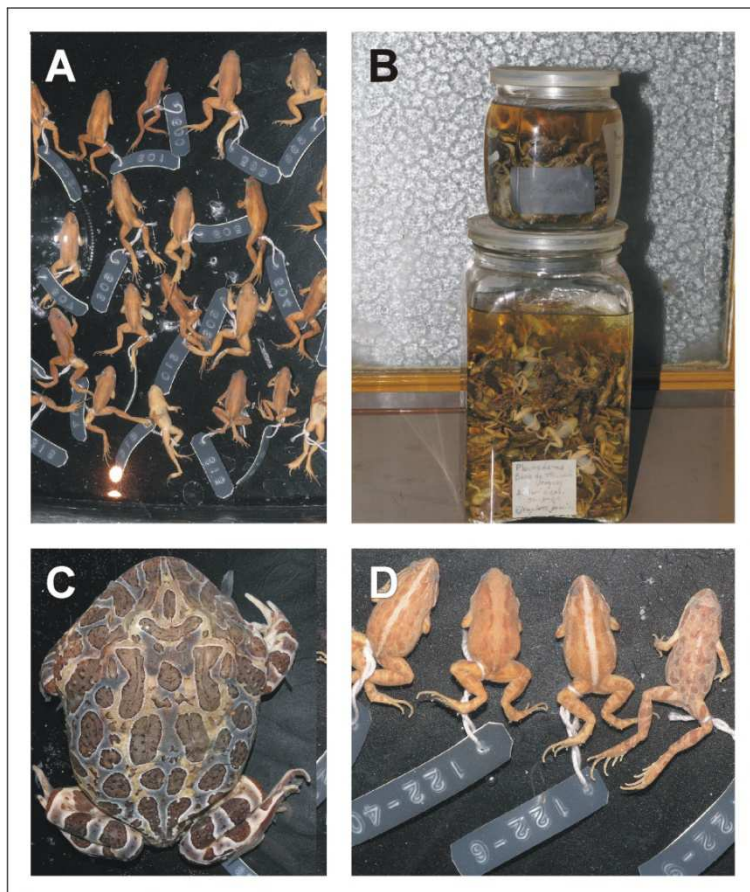
<sup>2</sup> Indica los mm de piel analizados al momento de detectar el primer esporangio esporulado.

<sup>3</sup> Total de esporangios esporulados/total de cortes histológicos.

<sup>4</sup> Total de esporangios esporulados/total de mm de piel.

## Estudio retrospectivo de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*

Se estudiaron cortes histológicos de piel abdominal y parche pélvico de ejemplares en colecciones, principalmente de las especies *Ceratophrys ornata* (n = 4), *Physalaemus fernandezae* (n = 20), *P. henselii* (n = 23) y *Pleurodema bibroni* (n = 44), figura 3.5. Adicionalmente se procesaron muestras de ejemplares de *Physalaemus gracilis* (n = 2) pertenecientes a poblaciones sintópicas. La muestra de especímenes estudiados corresponde a colectas realizadas entre los años 1953 y 1972, en poblaciones uruguayas hoy extintas (salvo por *P. gracilis*, obs. pers.). Se estudiaron 174 láminas conteniendo un total de 590 cortes histológicos, observados a 1000X. Todos los cortes analizados fueron negativos a la infección por *Bd*. En algunos casos las preparaciones a partir de viejos ejemplares no tuvieron calidad diagnóstica por el estado de conservación y no fueron tenidas en cuenta para el análisis (*P. fernandezae* CENAI 122/3; *P. henselii* CENAI 598, 599, 605–610; *Pl. bibroni* CENAI 8059, 8060, 8062, 8063, 8064–8066).



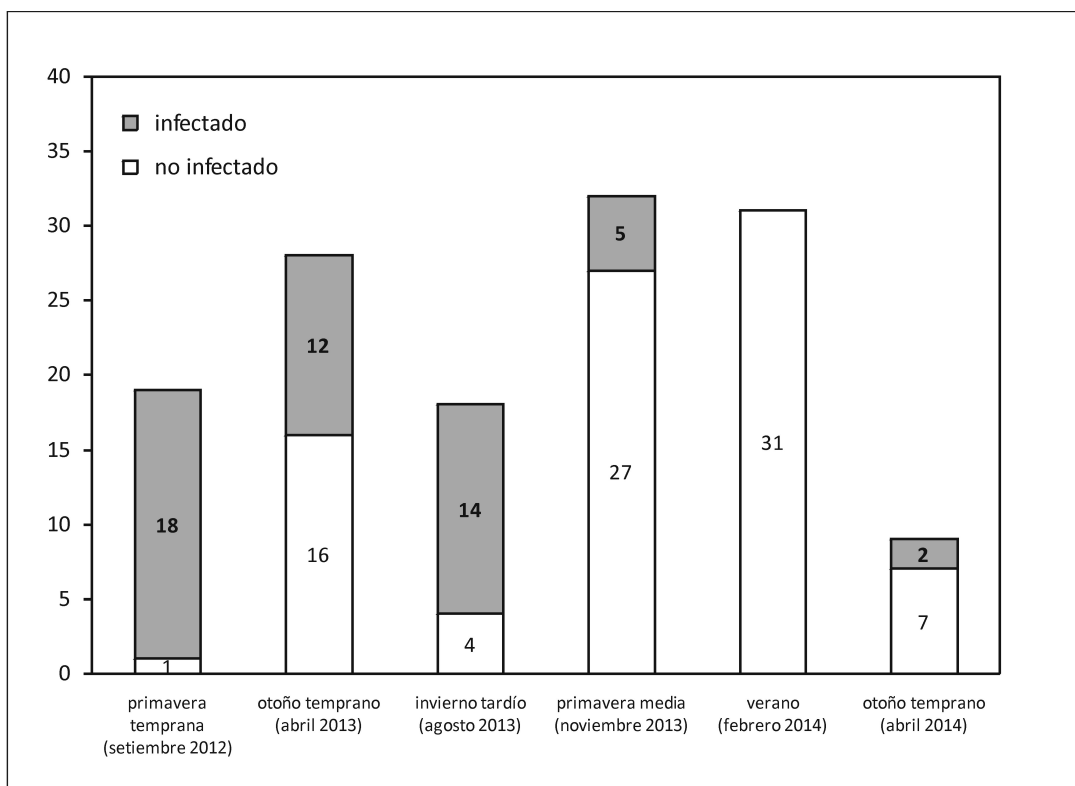
**FIGURA 3.5.** Anfibios de la colección herpetológica CENAI-MACN procedentes de la Barra del Río Santa Lucía, Uruguay, obtenidos por el herpetólogo argentino Avelino Barrio. **A**, *Physalaemus henselii*, lote CENAI 598–618 (1960s). **B**, *Pleurodema bibroni*, lote CENAI sin número (30/IX/1969). **C**, *Ceratophrys ornata*, ejemplar adulto CENAI 4478 (23/XI/1970). **D**, *Physalaemus fernandezae*, lote CENAI 122 (IX/1962).

**TABLA 3.4.** Muestreo histológico retrospectivo de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en ejemplares de colecciones.

Especie	Localidad/colector	Fecha	Acrónimos	Láminas	Cortes	Resultado
<i>Physalaemus fernandezae</i> (n = 20)	Santiago Vázquez, Dpto. Montevideo (Avelino Barrio)	IX/1962	CENAI 122(5, 9, 12, 15, 17, 20, 22, 26, 27, 29–31, 33, 35–39, 41)	59	246	-
	Arroyo Solís, Camino		CENAI 156(1)	1	6	-
	Pando-Punta del Este (A. Barrio)	VIII/1960	CENAI 156(2)	3	24	-
	Treinta y Tres (A. Barrio)	(1960s?)	CENAI 169	1	2	-
<i>Physalaemus henselii</i> (n = 23)	Barra del Río Santa Lucía, límite Dptos. de Montevideo-San José (A. Barrio)	(1960s?)	CENAI 600–604, 611, 612, 614–617	8	58	-
	Arroyo La Tuna, Dpto. de Canelones (A. Barrio)	II/1969	CENAI 3261, 3262	3	18	-
		VII/1968	CENAI 3069	1	4	-
<i>Physalaemus gracilis</i> (n = 2)	Sierra de las Ánimas, Dpto. de Maldonado (Pablo San Martín)	III/1953	ZVCB 191 ( <i>P. fernandezae</i> n = 2; <i>P. henselii</i> n = 2)	2	9	-
	La Pedrera, Dpto. de Rocha (A. Barrio)	III/1968	CENAI 8054, 8055	6	12	-
		10–14/II/1969	CENAI 4939–4941	7	20	-
	Arroyo Tropa Vieja, Dpto. de Canelones (José Eduardo García)	14/X/1970	CENAI 4951, 4954–4961, 4963, 4964	33	59	-
	Playa Pascual, Dpto. de San José (J. E. García)	(1970s?)	CENAI 4176–4178	3	6	-
<i>Pleurodema bibroni</i> (n = 44)	Barra del Río Santa Lucía, límite Dptos. de Montevideo-San José (A. Barrio)	30/IX/1969	CENAI s/nro. (n = 8)	8	42	-
		IV/1970	CENAI 3974	1	2	-
		16/VI/1972	CENAI 6252–6253, 6255, 6258, 6259, 6262, 6265, 6267–6269,	14	34	-
	<i>Ibid.</i> (Gilberto Dewailly)	17/VII/1972	CENAI 6339, 6382, 6408–6415, 6480–6483	9	18	-
		VII/1972	CENAI 8061	1	2	-
<i>Ceratophrys ornata</i> (n = 4)		23/XI/1970	CENAI 4478–4481	12	24	-
<b>TOTAL (n = 95)</b>		1953–1972	-----	174	590	-

## Estacionalidad de la infección en *Hypsiboas pulchellus*

La prevalencia de la infección por *Bd* en el total de la muestra de *Hypsiboas pulchellus* de La Paloma/Laguna de Rocha fue elevada, de los 137 ejemplares adultos estudiados, 56 estaban infectados (41 %). La infección presentó una marcada variación estacional, registrándose las prevalencias más altas en la primavera temprana (setiembre de 2012) e invierno (agosto de 2013). Los resultados crudos se muestran en la figura 3.6.



**FIGURA 3.6.** Variación estacional en la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Hypsiboas pulchellus*, La Paloma/Laguna de Rocha, Dpto. de Rocha. En las barras se indica el número de ejemplares estudiado.

La frecuencia de infección fue significativamente más baja en otoño (abril de 2013 y 2014), primavera avanzada (noviembre 2013) y verano, época esta última en la cual no se detectaron casos (0/31; febrero 2014). No se evaluaron diferencias por sexos ya que la muestra se compuso casi en su totalidad por machos. Las prevalencias correspondientes y las respectivas comparaciones se presentan en las tablas 3.5 y 3.6 respectivamente.

**TABLA 3.5.** Prevalencia de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Hypsiboas pulchellus* en distintas épocas del año, y sus correspondientes IC 95 %.

	Positivos/n	Prevalencia	IC
Setiembre 2012	18/19	0,95	0,75 – 0,99
Abril 2013	12/28	0,43	0,27 – 0,61
Agosto 2013	14/18	0,78	0,55 – 0,91
Noviembre 2013	5/32	0,16	0,07 – 0,32
Febrero 2014	0/31	0	0 – 0,11
Abril 2014	2/9	0,22	0,06 – 0,55

**TABLA 3.6.** Comparación de las prevalencias de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Hypsiboas pulchellus*. Se muestran valores de p para comparaciones utilizando el test exacto de Fisher. En negrita se indica  $p < 0,05$ .

	Setiembre 2012	Abril 2013	Agosto 2013	Noviembre 2013	Febrero 2014
Abril 2013	< <b>0,001</b>	-----			
Agosto 2013	0,153	0,201	-----		
Noviembre 2013	< <b>0,001</b>	0,199	< <b>0,001</b>	-----	
Febrero 2014	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>	0,286	-----
Abril 2014	< <b>0,001</b>	0,241	<b>0,009</b>	0,485	<b>0,046</b>

## Discusión

La detección de *Bd* en numerosas localidades pertenecientes a ambientes de serranías y costeros, amplían considerablemente la distribución conocida de este patógeno en Uruguay. Reportes previos de infección por *Bd* en anfibios nativos incluyen algunas de las localidades muestreadas en este estudio como Delta del Tigre y Laguna de Rocha (Borteiro *et al.* 2009). La información disponible sugiere que *Bd* estaría presente en todo el país, lo cual es coherente con los registros previos en zonas cercanas de Argentina y Brasil, en ambientes similares a los estudiados (Ghirardi 2011; Herrera *et al.* 2005; Toledo *et al.* 2006). La aptitud para la ocurrencia del patógeno en una amplia región del centro de Sudamérica incluyendo Uruguay, sureste de Brasil, este de Argentina y Paraguay había sido indicada previamente (Ron 2005).

Las especies nativas en las que se ha diagnosticado previamente la infección por *Bd* en Uruguay son *Hypsiboas pulchellus*, *Odontophrynus maisuma*, *Physalaemus henselii*, *Pleurodema bibroni* y *Scinax squalirostris* (Borteiro *et al.* 2009; Bardier *et al.* 2011). Los

nuevos hospedadores identificados para Uruguay en este Capítulo son *Dendropsophus sanborni*, *Julianus uruguayus*, *Limnomedusa macroglossa*, *Melanophryniscus sanmartini* y *Pseudis minutus*. Estas especies tienen distintos requerimientos ecológicos ya que están asociadas a diferentes tipos de ambientes, sus patrones de actividad también difieren, y reproducen en variados cuerpos de agua temporales y permanentes. Cuatro especies, *Pl. bibroni*, *P. henselii*, *H. pulchellus* y *J. uruguayus*, presentaron poblaciones positivas a la infección por *Bd* tanto en ambientes serranos como planicies costeras. Las dos primeras tienen una mayor actividad en las épocas más frías del año, habitan el pastizal y utilizan charcos temporales para su reproducción (Barrio 1953; 1964; 1977; Kolenc *et al.* 2009). Por su parte, *J. uruguayus*, especie muy común en serranías, puede detectarse con facilidad durante episodios de reproducción explosiva en épocas cálidas desde fines del invierno y hasta fines del verano (Kolenc *et al.* 2003). Esta especie habita zonas de praderas en torno a charcas temporales y semipermanentes. El pequeño sapo *M. sanmartini* también habita ambientes serranos y tiene una marcada actividad invernal (C. Borteiro & F. Kolenc, obs. pers.). En el caso de este género la infección por *Bd* fue solamente indicada para *Melanophryniscus moreirae*, especie de ambientes montañosos del sureste de Brasil (Van Sluys *et al.* 2007). Los restantes diagnósticos positivos en especies nativas de Uruguay incluyeron anfibios ampliamente distribuidos en praderas y la costa, con marcada actividad en épocas cálidas del año, como *Leptodactylus latrans* y *P. minutus*. Si bien *L. latrans* es común y está ampliamente distribuida en el centro-este de Sudamérica, existen escasos registros de infección por *Bd* en esta especie, todos de Argentina (Herrera *et al.* 2005 y Ghirardi *et al.* 2009, como *Leptodactylus ocellatus*; Ghirardi 2011; Agostini & Burrowes 2015).

Las altas prevalencias observadas en ejemplares postmetamórficos (~ 39 %), es similar a las de anfibios de Australia en la fase enzoótica de la infección por *Bd* luego de varios años de ocurridas las declinaciones poblacionales por quitridiomicosis (18–28 %, Retallick *et al.* 2004). Las altas prevalencias en especies con actividad invernal en ausencia de declinaciones aparentes, como por ejemplo en las poblaciones de *Physalaemus henselii* (53 %) y *Pleurodema bibroni* (88 %) de Oceanía del Polonio, podrían explicarse por un efecto favorable de las bajas temperaturas sobre la persistencia y actividad del patógeno. *Bd* crece y se reproduce satisfactoriamente *in vitro* entre 4 y 25 °C, con un rango óptimo de 17 a 25 °C (Piotrowsky *et al.* 2004). Gründler *et al.* (2012) encuentran que la prevalencia en la infección por *Bd* varía según la altitud y hábitat de reproducción en numerosas especies de anfibios de la Mata Atlántica, siendo de hasta un 92 % sin observarse declinaciones poblacionales. En un reciente estudio a gran escala en dicho bioma se encontró una prevalencia general de 23,9 %

sobre un total de 2799 especímenes estudiados, obtenidos en colectas realizadas entre los años 1894 y 2010 (Rodríguez *et al.* 2014). En zonas donde las condiciones ambientales para la presencia del patógeno no son tan favorables como la cuenca amazónica, las prevalencias observadas parecen ser bastante menores (Becker *et al.* 2016).

La variación estacional de la infección por *Bd* en *Hypsiboas pulchellus* con altas prevalencias en épocas frías del año está de acuerdo estudios previos, en los que se han reportado mayores prevalencias durante el invierno y primavera temprana (Berger *et al.* 2004; Woodhams & Alford 2005; Kriger & Hero 2007). En épocas cálidas más desfavorables *Bd* seguramente persiste con baja prevalencia.

No se observaron episodios de mortalidad masiva de anfibios a campo asociados a la infección por *Bd* (ver Apéndice 4). Sin embargo, algunos ejemplares de *Limnomedusa macroglossa* murieron en cautiverio con síntomas de quitridiomycosis severa. Ésta usualmente se presenta con letargia, inapetencia, signos neurológicos variados, poca respuesta a estímulos, síntomas variables en piel como decoloración, palidez, hiperemia, oscurecimiento, muda excesiva, erosiones y úlceras, y la muerte sobreviene en pocos días (Berger *et al.* 1999; Berger 2001; Rachowicz & Vredenburg 2004). *Limnomedusa macroglossa* se encuentra asociada a ambientes pedregosos y tiene una amplia distribución en Uruguay (Gudynas & Gerhau 1981), donde se considera no presenta mayores problemas de conservación (Carreira & Maneyro 2015). Su susceptibilidad a la quitridiomycosis amerita estudios más detallados.

La sensibilidad del diagnóstico histológico sobre material extraído de ejemplares positivos al PCR fue muy buena, algo superior a datos encontrados en la literatura (Boyle *et al.* 2004; Kriger *et al.* 2006; Hyatt *et al.* 2007). Las preparaciones histológicas realizadas sobre material fijado varias décadas atrás fueron en general de menor calidad, y no se pudo detectar en ellas la presencia de *Bd*. La aparente ausencia de infección en poblaciones hoy extintas de *Physalaemus fernandezae*, *P. henselii* y *Pleurodema bibroni* puede deberse a que la prevalencia de infección en la muestra es muy baja, y el número de ejemplares resultó entonces insuficiente. Cuando la prevalencia en la población es  $< 5\%$ , la detección de al menos un individuo portador requiere un  $n \geq 45$  y  $n \geq 59$  a un nivel de confianza de 90 y 95 % respectivamente (ej. ver DiGiacomo & Koepsell 1986). Si la desaparición de las poblaciones estudiadas fue debida a epidemias, éstas pueden haber sido afectadas por cepas patógenas de *Bd* luego de que se realizaran las últimas colectas sobre las mismas (hipótesis del patógeno nuevo). En poblaciones de hospedadores remanentes que sobrevivieron a la epidemia, la frecuencia de infección se encontraría en equilibrio. La discusión de este punto se retoma en el Capítulo 5, con la caracterización de las cepas de *Bd* presentes en el país.



## Referencias

- Agostini, M.G. & Burrowes, P.A. (2015) Infection patterns of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, on anuran assemblages in agroecosystems from Buenos Aires Province, Argentina. *Phyllomedusa*, 14(2), 113–126.
- Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P. & Longcore, J.E. (2004) A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(3), 420–428.
- Bardier, C., Ghirardi, R., Levy, M. & Maneyro, R. (2011) First case of chytridiomycosis in an adult specimen of a native anuran from Uruguay. *Herpetological Review*, 42(1), 65–66.
- Barrio, A. (1953) Sistemática, morfología y reproducción de *Physalaemus henselii* (Peters) y *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel) (Anura, Leptodactylidae). *Physis*, 20(59), 379–389.
- Barrio, A. (1964) Relaciones morfológicas, etoecológicas y zoogeográficas entre *Physalaemus henselii* (Peters) y *P. fernandezae* (Müller) (Anura, Leptodactylidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 20, 285–305.
- Barrio, A. (1977) Aportes para la elucidación del “status” taxonómico de *Pleurodema bibroni* Tschudi y *Pleurodema kriegi* (Müller) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Physis*, 37(93), 311–331.
- Barrionuevo, S. & Mangione, S. (2006) Chytridiomycosis in two species of *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(2), 171–174.
- Becker, C.G., Rodriguez, D., Lambertini, C., Toledo, L.F. & Haddad, C.F.B. (2016) Historical dynamics of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amazonia. *Ecography*, DOI: 10.1111/ecog.0205538.
- Berger, L. (2001) *Diseases in Australian frogs*. Tesis de Doctorado, James Cook University. Disponible en: <http://eprints.jcu.edu.au/17586>
- Berger, L., Speare, R., Hyatt, A.D. (1999) Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. En: Campbell, A. (ed.) *Declines and disappearances of Australian frogs*, Environment Australia, Canberra, pp. 23–33.
- Berger, L., Speare, R., Hines, H.B., Marantelli, G., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Skerratt, L.F., Olsen, V., Clarke, J.M., Gillespie, G., Mahony, M., Sheppard, N., Williams, C. & Tyler, M.J. (2004) Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal*, 82(7), 31–36.
- Berger, L., Speare, R. & Skerratt, L.F. (2005) Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs *Litoria caerulea* with severe chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68(1), 65–70.
- Borteiro, C., Aramburu, A., Kolenc, F. & Cruz, J.C. (2009) Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84(2), 159–162.
- Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T. & Hyatt, A.D. (2004) Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60(2), 141–148.
- Carreira, S. & Maneyro, R. (2015) Lista roja de los anfibios del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la herpetofauna de Uruguay sobre la base de los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo, 64 p.

- DiGiacomo, R.F. & Koepsell, T.D. (1986) Sampling for detection of infection or disease in animal populations. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189(1), 22–23.
- Garner, T.W.J., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham, A.A. & Fisher, M.C. (2006) The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, 2, 455–459.
- Ghirardi, R. (2011) *Estudio de quitridiomycosis por Batrachochytrium dendrobatidis en anfibios anuros del Litoral, Cuyo y Patagonia Argentina*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, 148 p.
- Ghirardi, R., Lescano, J.N., Longo, M.S., Robledo, G., Steciow, M.M. & Perotti, M.G. (2009) *Batrachochytrium dendrobatidis* in Argentina: first record in *Leptodactylus gracilis* and another record in *Leptodactylus ocellatus*. *Herpetological Review*, 40(2), 175–176.
- Gründler, M.C., Toledo, L.F., Parra-Olea, G., Haddad, C.F.B., Giasson, L.O.M., Sawaya, R.J., Prado, C.P.A., Araujo, O.G.S., Zara, F.J., Centeno, F.C. & Zamudio, K.R. (2012) Interaction between breeding habitat and elevation affects prevalence but not infection intensity of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazilian anuran assemblages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97(3), 173–184.
- Gudynas, E. & Gerhau, A. (1981) Notas sobre la distribución y ecología de *Limnomedusa macroglossa* (Duméril & Bibron, 1841) en Uruguay (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia (Zoologia)*, 60, 81–99.
- Herrera, R.A., Steciow, M.M. & Natale, G.S. (2005) Chytrid fungus parasitizing the wild amphibian *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) in Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(3), 247–252.
- Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Olsen, V., Boyle, D.B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F. & Collong, A. (2007) Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*.
- Kolenc, F., Borteiro, C. & Tedros, M. (2003) La larva de *Hyla uruguayana* Schmidt (1944) (Anura: Hylidae), con comentarios sobre su biología en Uruguay y su status taxonómico. *Cuadernos de Herpetología*, 17(1–2), 87–100.
- Kolenc, F., Borteiro, C., Baldo, D., Ferraro, D. & Prigioni, C. (2009) The tadpoles and advertisement calls of *Pleurodema bibroni* Tschudi and *Pleurodema kriegi* (Müller), with notes on their geographic distribution and conservation status (Amphibia, Anura, Leiuperidae). *Zootaxa*, 1969, 1–35.
- Kriger, K.M., Hero, J.M. & Ashton, K.J. (2006) Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71(2), 149–154.
- Kriger, K.M. & Hero, J.M. (2007) Large-scale seasonal variation in the prevalence and severity of chytridiomycosis. *Journal of Zoology*, 271(3), 352–359.
- Langone, J.A., Maneyro, R. & Arrieta, D. (2004) Present knowledge of the status of amphibian conservation in Uruguay. En: Wilkinson, J.W. (ed.) *Collected DAPTF Working Group Reports: Ten Years on*. Declining Amphibian Populations Task Force - DAPTF, The Open University, U.K., pp. 83–87.
- Maneyro, R. & Langone, J.A. (2001) Categorización de los Anfibios del Uruguay. *Cuadernos de Herpetología*, 15(2), 107–118.
- Mazzoni, R., Cunningham, A.A., Daszak, P., Apolo, A., Perdomo, E., Speranza, G. (2003) Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade.

- Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 995–998.
- Newcombe, R. G. (1998) Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. *Statistics in Medicine*, 17, 857–872.
- Piotrowsky, J.S., Annis, S.L. & Longcore, J.E. (2004) Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9–15.
- Rachowicz, L.J. & Vredenburg, V.T. (2004) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1–2), 75–83.
- Retallick, R.W.R., McCallum, H. & Speare, R. (2004) Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLoS Biology*, 2(11), e351.
- Rodriguez, D., Becker, C.G., Pupin, N.C., Haddad, C.F.B. & Zamudio, K.R. (2014) Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Molecular Ecology*, 23(4), 774–787.
- Ron, S. (2005) Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*, 37(2), 209–221.
- Siegel, S. (1956) *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. McGraw-Hill, New York, 132 p.
- Stuart, S.N., Hoffman, M., Chanson, J.S., Cox, R.J., Ramani, P. & Young, B.E. (2008) *Threatened Amphibians of the World*. Lynx Ed., IUCN - The World Conservation Union, Conservation International and Nature Serve.
- Toledo, L.F., Britto, F.B., Araújo, O.G.S., Giasson, L.M.O. & Haddad, C.F.B. (2006) The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. *South American Journal of Herpetology*, 1(3), 185–191.
- Van Sluys, M., Ferreira, T.K., Lamarão, F.R.M. & Moraes, M.O. (2007) *Batrachochytrium dendrobatidis* infects *Melanophryniscus moreirae* (Anura Bufonidae) from an Atlantic Rainforest area (Itatiaia), southeastern Brazil. *Froglog*, 84, 6–8.
- Wilson, E.B. (1927) Probable inference, the Law of Succession, and statistical inference. *Journal of the American Statistical Association*, 22(158), 209–212.
- Woodhams, D.C. & Alford, R.A. (2005) Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biology*, 19(5), 1449–1459.

## Quitridiomicosis en anfibios introducidos

### Resumen

En este Capítulo se investiga la ocurrencia de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) en anfibios introducidos a Uruguay. Los diagnósticos se realizaron mediante histopatología y PCR, estos últimos a partir de hisopados y muestras de piel. Se estudiaron 97 especímenes pertenecientes a 16 especies. Tres de ellas fueron positivas a la infección, dos de las cuales, *Ceratophrys ornata* (1/1) y *Xenopus laevis* (1/15), son comunes en el mercado internacional de anfibios vivos. La tercera especie, la Rana toro norteamericana *Lithobates catesbeianus*, se ha introducido en numerosas regiones principalmente para consumo humano. En ésta se detectó la infección en ejemplares de criadero (adultos 20/20, larvas 1/2) y silvestres (adultos 8/12, larvas 4/5). La introducción de estas especies de anfibios en Uruguay ocurrió a partir de los años 1980s, siendo *L. catesbeianus* la más importante como vector de *Bd*, debido a la dispersión alcanzada y al establecimiento de poblaciones silvestres. La falta de controles sanitarios adecuados constituye un riesgo potencial creciente para las especies nativas de anfibios de Uruguay. Asimismo debería implementarse un plan de control de Rana toro silvestre en el norte del país.

## Introducción

El comercio internacional de anfibios es uno de los factores que han contribuido a la propagación de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) a escala global. Dos especies consideradas vectores relevantes de este patógeno son de la Rana toro norteamericana *Lithobates catesbeianus*, y la rana de uñas africana, *Xenopus laevis* (Weldon *et al.* 2004; Daszak *et al.* 2004). Ambas son portadores asintomáticos de la infección. La primera fue comercializada intensamente a partir de los años 1930s, exportándose colonias desde EEUU con el fin de establecer criaderos productores de carne para consumo humano (ej. Vizotto 1984). A consecuencia de ello ha establecido poblaciones invasoras en muchas regiones (Ficetola *et al.* 2007), incluido Uruguay (Laufer *et al.* 2008). En Uruguay, la presencia de *Bd* fue detectada inicialmente en criaderos de *L. catesbeianus* (Mazzoni *et al.* (2003; Garner *et al.* (2006). Más tarde, la infección es detectada en ejemplares silvestres de especies nativas provenientes del norte del país y localidades costeras (Borteiro *et al.* 2009; Bardier *et al.* 2011).

Las ranas acuáticas africanas del género *Xenopus* fueron exportadas desde el sur de África al hemisferio norte desde fines del siglo XIX para ser utilizadas como animal de investigación y compañía, principalmente *X. laevis* (Gurdon & Hopwood 2000). El desarrollo de pruebas biológicas de embarazo en humanos (Shapiro & Zwarenstein 1934) llevó a la su comercialización masiva internacionalmente a partir de mediados de los años 1930s (Weldon *et al.* 2004; Fisher & Garner 2007). Actualmente, *X. laevis* se cría como animal de compañía y experimentación (Fisher & Garner 2007). Esta especie es potencialmente invasora, con poblaciones silvestres conocidas en Francia, Italia, Portugal, Reino Unido, California, Chile y Japón (Measey *et al.* 2012).

El rol de especies de anfibios introducidas en la dispersión de patógenos ha sido investigado recientemente, principalmente en relación a la presencia de *Bd* (Gilbert *et al.* 2013; Kolby *et al.* 2014). En este Capítulo se investiga la ocurrencia de infección por *Bd* en especies de anfibios introducidas, con énfasis en *L. catesbeianus*. Se procuró además recabar información sobre el origen y uso de las especies de anfibios exóticas en el país, para valorar su importancia como vectores de *Bd*.

# Objetivos

## Objetivo general

Investigar la ocurrencia de infección por *Bd* en especies de anfibios introducidas a Uruguay.

## Objetivos específicos

- 1) Estudiar la presencia de infección por *Bd* en criaderos y ejemplares silvestres de Rana toro norteamericana, *Lithobates catesbeianus*.
- 2) Estudiar la presencia de infección por *Bd* en *Xenopus laevis* y otras especies de anfibios en cautiverio, introducidas al país para su cría como animales de compañía.

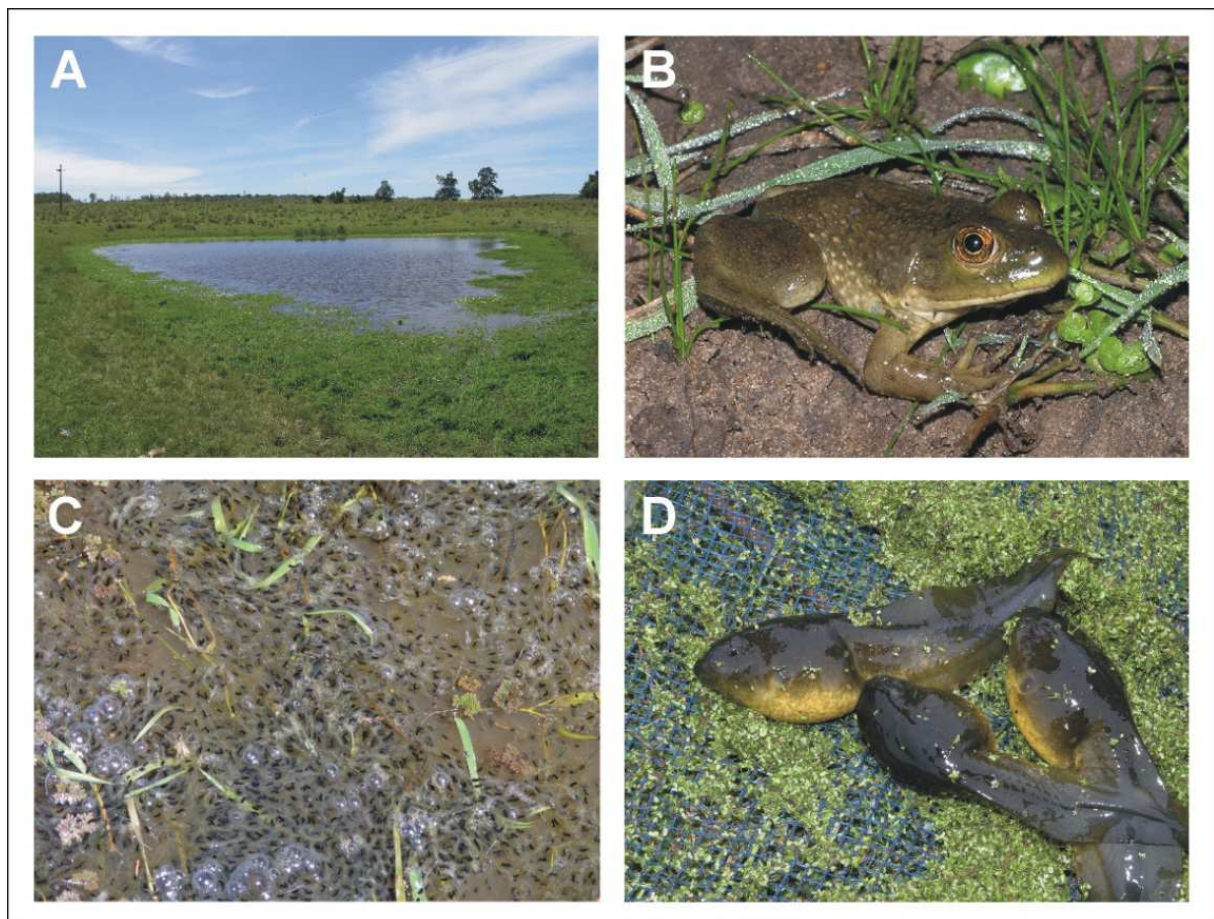
# Materiales y métodos

## Muestreo y diagnóstico

Se analizaron muestras de 97 ejemplares pertenecientes a 16 especies de anfibios introducidas en Uruguay, la mayoría de ellos mantenidos en cautiverio en colecciones privadas. Un total de 38 muestras correspondieron a la Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*), provenientes principalmente del criadero comercial “Ña Ramona” situado 5 km al SE de la ciudad de Libertad, Dpto. de San José (34°41' S, 56°35' W). Se estudiaron además larvas capturadas en instalaciones de criaderos de la misma especie abandonados, en Rincón de Pando (34°44' S, 55°55' W; ver Laufer *et al.* 2008), Dpto. de Canelones, y en el Arroyo Bizcocho (33°27' S, 58°10' W), 7 km al NE de la ciudad de Dolores, Dpto. de Soriano. Muestras adicionales fueron obtenidas de una población silvestre en las instalaciones abandonadas de un criadero 2 km al S de Aceguá (31°53' S, 54°09' W), Dpto. de Cerro Largo, figura 4.1.

Se analizaron también muestras de 15 especímenes de *Xenopus laevis* adquiridos en el mercado de animales de compañía. Algunos de ellos provinieron de un criadero situado en Rincón del Cerro, Montevideo (MNHN 9524), que comenzó con la cría comercial de esta especie en el país y que al momento de culminar este estudio ya no existía. Adicionalmente se muestrearon 45 ejemplares de otras 14 especies exóticas en colecciones privadas, incluyendo especímenes capturados en la naturaleza.

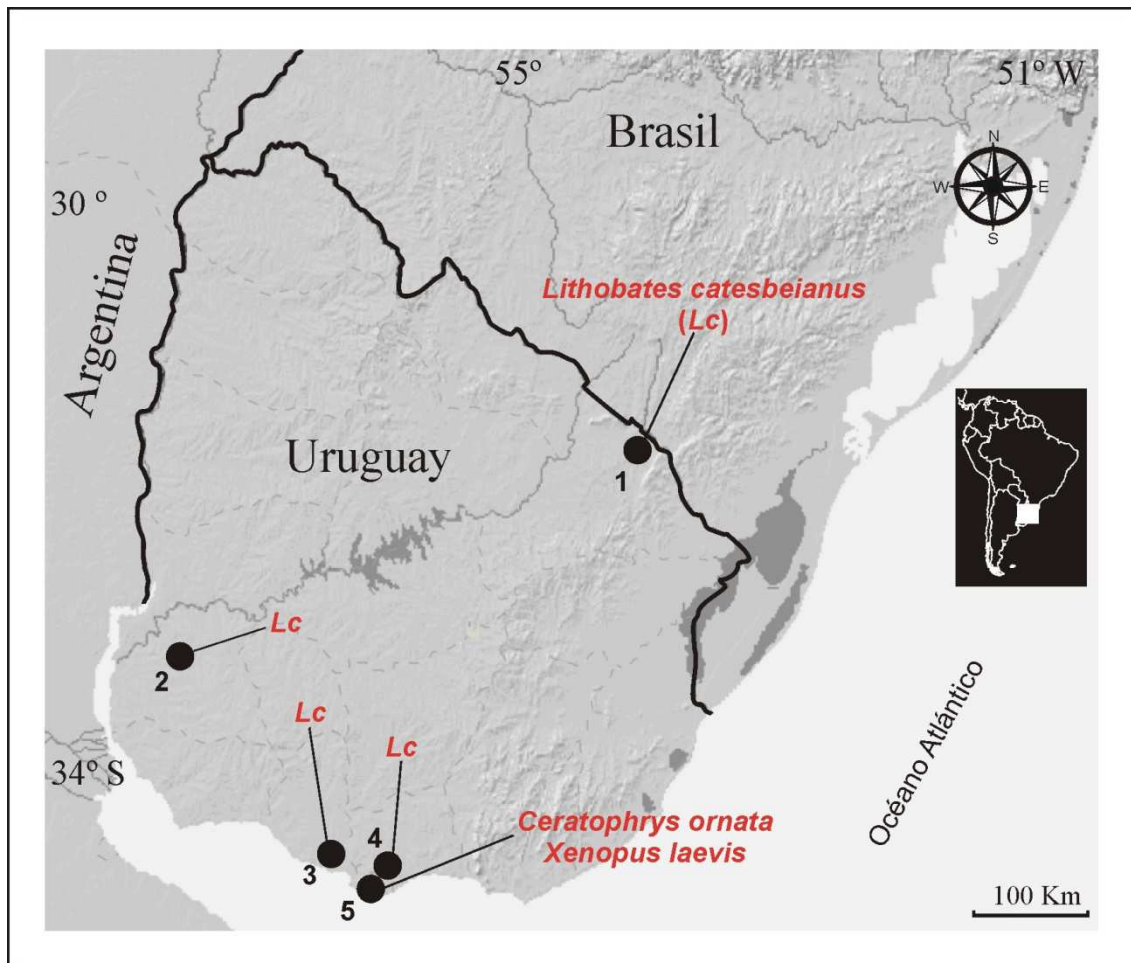
Los diagnósticos se realizaron mediante PCR e histología convencional, según se describe en los capítulos 2 y 3. Las muestras para PCR de *Xenopus laevis* y la población silvestre de *Lithobates catesbeianus* fueron trozos de piel del parche pélvico de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> obtenidos mediante disección inmediatamente después de practicada la eutanasia. Las muestras del resto de los ejemplares consistieron en hisopados de piel.



**FIGURA 4.1.** Población silvestre de *Lithobates catesbeianus* en Aceguá, Dpto. de Cerro Largo, Uruguay. **A**, hábitat, tajamar utilizado como abrevadero para ganado. **B**, ejemplar juvenil (V/2012). **C**, vista parcial de una puesta en un tajamar (XI/2011). **D**, larvas capturadas con red de arrastre, estadio 31, tamaño aproximado 15 cm (XI/2011).

## Resultados

La infección por *Bd* se detectó en un ejemplar de *Ceratophrys ornata* introducido al país proveniente de Argentina, y en las especies exóticas *Lithobates catesbeianus* y *Xenopus laevis*. La localización geográfica de estos diagnósticos se indica en la figura 4.2.



**FIGURA 4.2.** Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios introducidos a Uruguay. Localidades: 1, Aceguá; 2, Arroyo Bizcocho; 3, Libertad; 4, Rincón de Pando; 5, Montevideo.

### *Lithobates catesbeianus*

Esta especie fue introducida ilegalmente a Uruguay en 1984 desde Brasil por parte de productores rurales que realizaron intentos de cría infructuosos (C. Prigioni, com. pers.). En

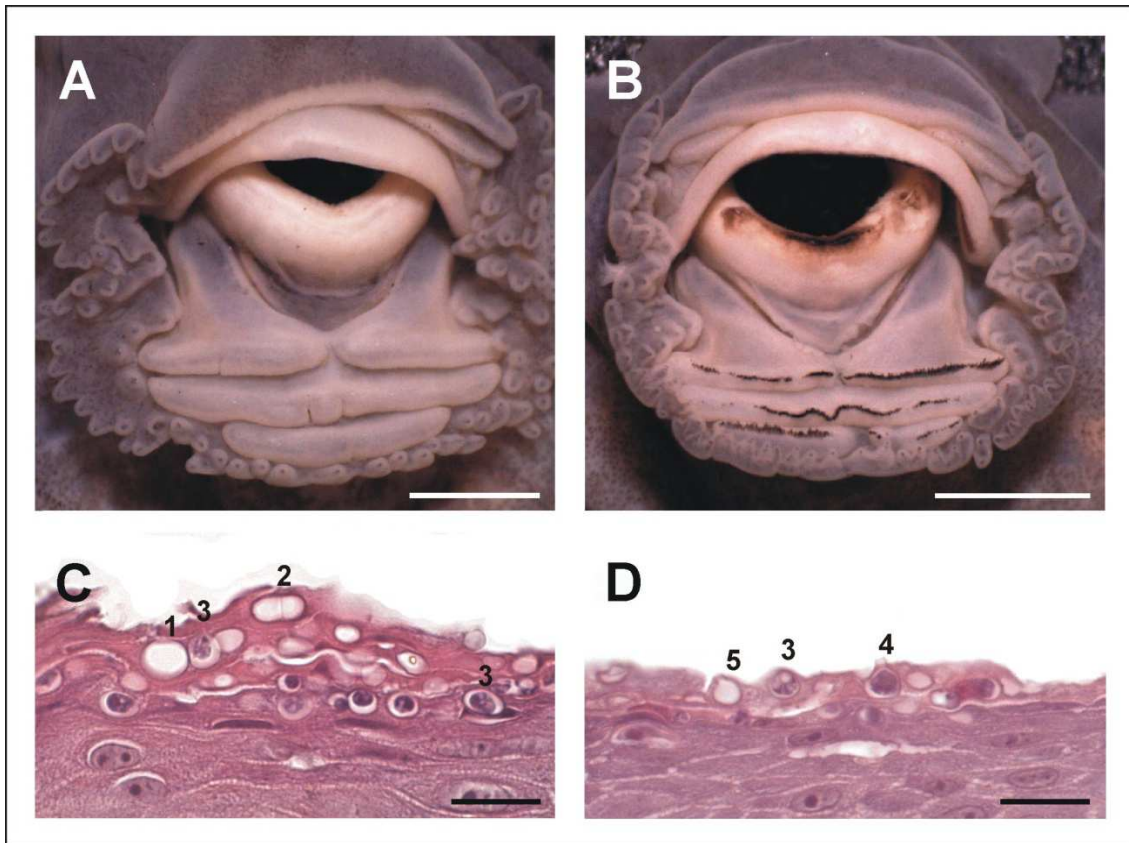


1986 es introducida nuevamente desde aquel país por organizaciones gubernamentales, que difundieron la implementación de sistemas de producción de carne intensivos (Amestoy *et al.* 1998; Mazzoni 2001). A principios de los 1990s numerosos establecimientos estaban activos (Mazzoni & Carnevia 1996; Mazzoni 2001; Spinetti 2003), pero en una década la mayoría cerraron. Ejemplares de criaderos en abandono establecieron poblaciones silvestres, de las que al momento parecen persistir una en Aceguá en el Dpto. de Cerro Largo y otra en San Carlos, Dpto. de Maldonado (Laufer *et al.* 2008; Lombardo *et al.* 2016; G. Laufer, datos no publ.). El criadero aquí muestreado era el único de su tipo en el país al momento de realizarse este estudio, presentando muy baja producción. En todos los sitios *Lithobates catesbeianus* fue portadora de *Bd*, con alta frecuencia de infección. Los resultados se indican en la tabla 4.1, e imágenes de los diagnósticos se muestran en las figuras 4.3 y 4.4.

**TABLA 4.1.** Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*) de Uruguay.

Estadio	Origen	Fecha	Diagnóstico (número de la muestra)	Positivos/n, % (IC)
Larva		16/X/2010	PCR* (BKT 3086)	1/2
Larva	Criadero activo, próximo a Libertad, Dpto. de San José	16/X/2010	Histología (BKT 3086)	1/1
Adulto		16/X/2010	PCR (BKT 3088, sexo indeterminado)	20/20, 100 % (IC 83,9–100)
Larva	Criadero abandonado, Arroyo Bizcocho, Dolores, Dpto. de Soriano	2009	Histología	1/1
Larva	Criadero abandonado, Rincón de Pando, Dpto. de Canelones	IV/2005	Histología	1/1
Adultos/ sub adultos	Población silvestre, Aceguá, Dpto. de Cerro Largo	8–9/IX/ 2011	PCR, muestras de piel (BKT 3353–3355 ♀♀, 3356 juvenil, 3647–3654)	8/12, 67 % (IC 0,39–0,86)
Larva		8/IX/2011	Histología	1/1
<b>TOTAL</b>				<b>33/38, 86,8 %</b>

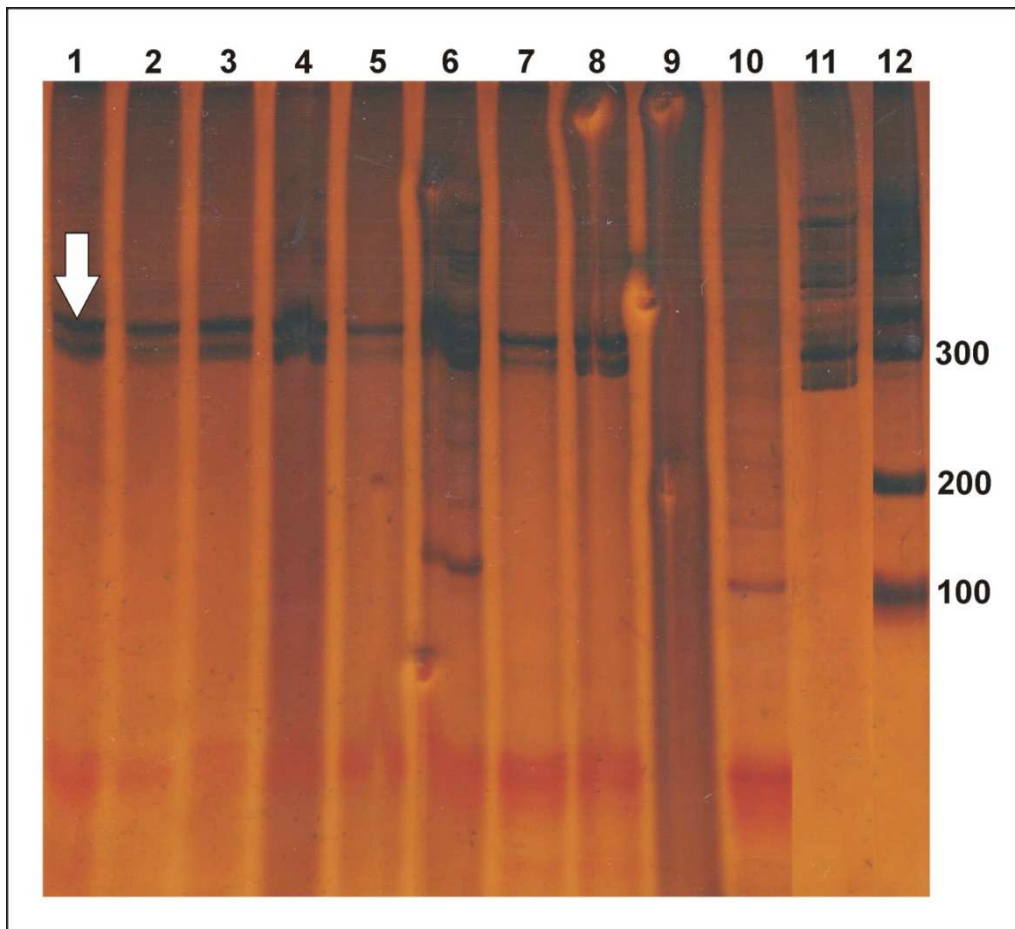
\* Ver Capítulo 3, figura 3.1.



**FIGURA 4.3.** Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en larvas *Rana toro* norteamericana (*Lithobates catesbeianus*) de Uruguay. **A** y **B**, discos orales de ejemplares de Rincón de Pando, Dpto. de Canelones, y Arroyo Bizcocho, Dpto. de Soriano. En ambos casos se observa notoria falta de queratina (coloración oscura). Barras = 2 mm. **C** y **D**, cortes histológicos respectivos donde se observan numerosos esporangios vacíos (1), con septos (2), endosporas (3), esporangios maduros con tubos de descarga (4), y esporangios vacíos con tubos de descarga (5); tinción H&E. Barras = 20  $\mu$ m.

### *Xenopus laevis* y otras especies

*Xenopus laevis* se cría actualmente en Uruguay para el mercado local de animales de compañía, y no se conocen en el país poblaciones silvestres. La mayoría de los ejemplares comercializados, son descendientes de una pequeña colonia de reproductores ingresados a un criadero en Montevideo desde Argentina en 1993 (M. Martínez, com. pers.). El mismo comercializó la especie localmente desde 1995 hasta fines del 2011, y exportó miles de individuos ilegalmente a Rio Grande do Sul, desde 1997 a 2000 (M. Martínez, com. pers.). Previo a su cierre se adquirieron en el mismo 11 ejemplares (lote MNHN 9524), uno de los cuales resultó positivo al PCR (muestra BKT 3291), siendo la prevalencia 0,09 (1/15).



**FIGURA 4.4.** Diagnóstico de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en adultos de Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*) de Uruguay. Se muestra una corrida electroforética de productos de PCR en gel de poliacrilamida. Carriles 1–8, ejemplares de criadero positivos; 9, control negativo, ADN molde de hígado de anfibio (*Melanophryniscus montevidensis* MNHN 9522); 10, control negativo sin ADN molde; 11, control positivo, cepa JEL423; 12, marcador de tamaño (pares de bases). La flecha señala la amplificación de dos fragmentos, de aproximadamente 300 y 330 pb (ver Capítulo 3).

El ejemplar de *Ceratophrys ornata* también resultó positivo a *Bd*. Originario de Argentina, fue colectado en la naturaleza e introducido junto a otros de la misma especie en 1986, y mantenido desde entonces en un terrario individual. Las restantes muestras correspondientes a anuros del género *Bombina* y urodelos de los géneros *Hypsilotriton*, *Ichthyosaura*, *Lissotriton*, *Neurergus*, *Pleurodeles*, *Triturus* y *Tylotriton*, fueron negativas. Una síntesis de los resultados se muestra en la tabla 4.2.

**TABLA 4.2.** Anfibios del mercado de animales de compañía y colecciones privadas en Uruguay estudiados mediante PCR para la detección de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Especie	Origen (número del hisopo)	Fecha de muestreo	Positivos/n
<b>ANURA</b>			
<i>Bombina orientalis</i>	Criadero	XI/2013	0/4
<i>Ceratophrys ornata</i>	Silvestre, Argentina (BKT 3656)	IX/2013	1/1
<i>Xenopus laevis</i> (var. albino)	Criadero, Atlántida (MNHN 9523)	29/I/2011	0/4
	Criadero, Montevideo (MNHN 9524)	13/VII/2011	1/11
<b>URODELA</b>			
<i>Hypselotriton cyanurus cyanurus</i>	Criadero, Montevideo	XI/2013	0/4
<i>Hypselotriton orientalis</i>	Criadero, Montevideo	XI/2013	0/1
<i>Ichthyosaura alpestris apuanus</i>	Criadero, Montevideo	XI/2013	0/3
<i>Lissotriton italicus</i>	Criadero, Montevideo	XI/2013	0/2
<i>Neurergus</i> sp.	Criadero, Montevideo	XI/2013	0/3
<i>Neurergus crocatus</i>	Población silvestre, Turquía	XI/2013	0/4
<i>Neurergus strauchii strauchii</i>	Criadero, Montevideo	XI/2013	0/1
	Criadero, Montevideo	XI/2013	0/1
<i>Pleurodeles waltl</i>	Acuario comercial, Montevideo (BKT 3834, 3835)	XII/2013	0/5
<i>Triturus dobrogicus</i>	Criadero, Montevideo	XI/2013	0/4
<i>Triturus marmoratus</i>	Criadero, Montevideo	XI/2013	0/8
<i>Tylotriton verrucosus shanjing</i>	Población silvestre, China	XI/2013	0/1
<i>Tylotriton verrucosus verrucosus</i>	Criadero, Montevideo	XI/2013	0/3
TOTAL			2/55 (9,1 %)

## Discusión

La infección por *Bd* en anfibios introducidos a Uruguay se detectó en tres especies ampliamente comercializadas internacionalmente, *Ceratophrys ornata*, *Xenopus laevis* y *Lithobates catesbeianus*. La primera, a pesar de ser muy popular como animal de compañía y ornamental (Prestridge *et al.* 2011; Winters *et al.* 2014), no es comúnmente criada o comercializada en el país por lo que su ingreso al parecer no presenta actualmente relevancia epidemiológica como vector de *Bd*. La infección asintomática por *Bd* en esta especie en cautiverio fue previamente reportada por Une *et al.* (2008) y Goka *et al.* (2009) para Japón, y se conoce un caso de mortalidad aparentemente debida a quitridiomycosis en los Estados Unidos (Nichols *et al.* 1998). Resulta particularmente interesante que el ejemplar estudiado presentó infección por *Bd* luego de ser mantenido aislado en un acua-terrario. Esto tiene

implicancias epidemiológicas, ya que un ejemplar aislado en cautiverio puede ser un vector potencial de *Bd*, aún décadas después de haber adquirido la infección.

Los resultados obtenidos muestran además por primera vez la presencia de *Bd* en ejemplares de anfibios exóticos asilvestrados en Uruguay. El hallazgo de varias poblaciones de *Lithobates catesbeianus* positivas a *Bd* es coherente con reportes previos de esta infección en varios establecimientos de cría de esta especie en el país (Mazzoni *et al.* 2003; Garner *et al.* 2006) y en poblaciones de la región (Schloegel *et al.* 2009; Girhardi *et al.* 2011). La elevada prevalencia en la muestra estudiada sugiere que esta especie invasora ha sido un importante vector para la dispersión de dicho patógeno en Uruguay. La transmisión de patógenos a poblaciones silvestres de anfibios seguramente se vio favorecida por varios factores, entre ellos el vertido de efluentes desde los sistemas de producción sin tratamiento previo y los escapes de individuos. Además, los sistemas de cría de ranas implementados en el país permiten el ingreso de anfibios nativos a los encierros, principalmente hílidos (Mazzoni *et al.* 2003; obs. pers.).

El establecimiento de poblaciones silvestres de *Lithobates catesbeianus* fuera de su rango de distribución natural es un serio problema ecológico a escala global, poblaciones invasoras son conocidas en numerosos países de Asia, Europa y las Américas (Ficetola *et al.* 2007). La cuenca del Río de la Plata, incluido nuestro país, es potencialmente muy apta para el establecimiento de poblaciones silvestres de esta especie (Giovanelli *et al.* 2008; Ficetola *et al.* 2007; Nori *et al.* 2011). Numerosas poblaciones invasoras son conocidas en Argentina y el sureste de Brasil (Both *et al.* 2011; Nori *et al.* 2011). A la introducción potencial de patógenos con *L. catesbeianus*, se suma el efecto deletéreo que tiene esta especie sobre anfibios nativos (Kiesecker *et al.* 2001; da Silva *et al.* 2011; Boelter *et al.* 2012). En Uruguay deberían tomarse medidas urgentes para planificar el control y eventual erradicación de la población silvestre conocida.

El ingreso de *Xenopus laevis* a Uruguay fue mucho más reciente que en el hemisferio norte, posiblemente debido al uso local de especies nativas con fines biomédicos. Alternativamente a la utilización de *Xenopus*, las pruebas biológicas de embarazo se realizaron en Uruguay siguiendo la técnica de Galli Mainini (1947) con machos del sapo nativo *Rhinella arenarum*, hasta que métodos bioquímicos estuvieron disponibles a mediados de los años 1970s (Klappenbach & Orejas-Miranda 1969; D. Carnevia, com. pers.). Si bien no se han detectado poblaciones silvestres de *X. laevis* en Uruguay, su comercio creciente y la detección de *Bd* en individuos criados a partir del stock de cría original son un potencial problema de conservación para especies nativas.

La muestra de *Xenopus laevis* analizada en este estudio es pequeña, pero podemos decir que la prevalencia de infección por *Bd* observada (6,7 %) es intermedia con respecto a lo reportado en la literatura. En poblaciones silvestres del continente africano ésta se sitúa en 2,7–2,8 % en ejemplares de museo (Weldon *et al.* 2004; Vredenburg *et al.* 2013). Por otra parte, en estudios sobre poblaciones silvestres de EEUU y Chile, las prevalencias fueron de 13 y 24 % respectivamente (Solís *et al.* 2010; Vredenburg *et al.* 2013).

Ejemplares de otras especies de anfibios exóticas no incluidas en este estudio, provenientes de poblaciones silvestres, han sido importados ocasionalmente en forma ilegal desde Argentina principalmente a partir de la década de 1980s (obs. pers.): *Ceratophrys cranwelli*, *Hypsiboas faber*, *Lepidobatrachus* sp., *Leptodactylus laticeps* y *Phyllomedusa sauvagii*. También ingresan esporádicamente desde dicho país de especímenes criados en cautiverio de *C. cranwelli* (albino), *Bombina orientalis*, *Dendrobates auratus*, *Litoria caerulea* y diversas especies de tritones y salamandras como *Cynops pyrrhogaster*, *Notophthalmus viridescens*, *Paramesotriton hongkonensis*, *Pleurodeles waltl* y *Taricha torosa* (obs. pers.). Algunas de estas especies son actualmente criadas y vendidas en el mercado local, por ejemplo *P. waltl*.

En suma, existe en Uruguay desde hace ya varias décadas un incremento en la introducción de especies foráneas de anfibios comercializados vivos con fines productivos, ornamentales, como animales de compañía y por parte de coleccionistas. Esta tendencia acompaña un fenómeno global de aumento en el comercio de estas especies (Schlaepfer *et al.* 2005), cuya práctica lleva asociado un alto riesgo de establecimiento de poblaciones invasoras (Keller & Lodge 2007), con la consecuente dispersión de parásitos y microorganismos patógenos como *Bd* (Schloegel *et al.* 2010; Rodgers *et al.* 2011). La importación de anfibios vivos en nuestro país, su cría y comercialización habrían contribuido a la introducción y dispersión de *Bd* en amplias zonas del territorio, principalmente con la Rana toro como vector. Sería deseable la implementación de protocolos sanitarios para el ingreso de ejemplares vivos y el monitoreo de criaderos con el fin de minimizar el riesgo de dispersión de patógenos (ver Murray *et al.* 2011). Esto debería acompañarse de información dirigida para el público general, que usualmente desconoce los potenciales efectos nocivos de la introducción, cría y liberación accidental o intencional de ciertas especies.

# Referencias

- Amestoy, F., Spinetti, M. & Fabiano, G. (1998) Aquatic species introduced in Uruguay. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 26, 2170–2173.
- Bardier, C., Ghirardi, R., Levy, M. & Maneyro, R. (2011) First case of chytridiomycosis in an adult specimen of a native anuran from Uruguay. *Herpetological Review*, 42(1), 65–66.
- Boelter, R.A., Kaefer, I.L., Both, C. & Cechin, S. (2012) Invasive bullfrogs as predators in a Neotropical assemblage: What frog species do they eat? *Animal Biology*, 62, 397–408.
- Borteiro, C., Aramburu, A., Kolenc, F. & Cruz, J.C. (2009) Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84(2), 159–162.
- Both, C., Lignau, R., Santos-Jr., A., Madalozzo, B., Lima, L.P. & Grant, T. (2011) Widespread occurrence of the American Bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), in Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 6(2), 127–134.
- da Silva, E.T., Ribeiro Filho, O.P. & Feio, R.N. (2011) Predation of native anurans by invasive bullfrogs in southeastern Brazil: spatial variation and effect of microhabitat use by prey. *South American Journal of Herpetology*, 6(1), 1–10.
- Daszak, P., Strieby, A., Cunningham, A.A., Longcore, J.E., Brown, C.C. & Porter, D. (2004) Experimental evidence that the Bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal*, 14(4), 201–207.
- Ficetola, G.F., Thuiller, W. & Miaud, C. (2007) Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species — the American bullfrog. *Diversity and Distributions*, 13, 476–485.
- Fisher, M.C. & Garner, T.W.J. (2007) The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, 21, 2–9.
- Galli Mainini, C. (1947) Pregnancy test using the male toad. *Journal of Clinical Endocrinology*, 7(9), 653–658.
- Garner, T.W.J., Perkins, M.W., Govindarajulu, P., Seglie, D., Walker, S., Cunningham, A.A. & Fisher, M.C. (2006) The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biology Letters*, 2, 455–459.
- Gilbert, M., Bickford, D., Clark, L., Johnson, A., Joyner, P.H., Keatts, L.O., Khammavong, K., Vãn, L.N., Newton, A., Seow, T.P.W., Robertson, S., Silithammavong, S., Singhalath, S., Yang, A. & Seimon, T.A. (2013) Amphibian pathogens in southeast Asian frog trade. *EcoHealth*, 9(4), 386–398.
- Giovanelli, J.G.R., Haddad, C.F.B. & Alexandrino, J. (2008) Predicting the potential distribution of the alien invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. *Biological Invasions*, 10(5), 585–590.
- Girhardi, R., López, J.A., Scarabotti, P.A., Steciow, M.M. & Perotti, M.G. (2011) First record of the chytrid fungus in *Lithobates catesbeianus* from Argentina: exotic species and conservation. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 1337–1339.
- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Susuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S.,

- Mizutani, T. & Hyatt, A. (2009) Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18, 4757–4774.
- Gurdon, J.B. & Hopwood, N. (2000) The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology*, 44, 43–50.
- Keller, R.P. & Lodge, D.M. (2007) Species invasions from commerce in live aquatic organisms: problems and solutions. *Bioscience*, 57(5), 428–436.
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R. & Miller, C.L. (2001) Potential mechanisms underlying the displacement of native Red-Legged frogs by introduced Bullfrogs. *Ecology*, 82(7), 1964–1970.
- Klappenbach, M.A. Orejas-Miranda, B (1969) Anfíbios y Reptiles. *Nuestra Tierra (Montevideo)*, 11, 1–68.
- Kolby, J.E., Smith, K.M., Berger, L., Karesh, W.B., Preston, A., Pessier, A.P. & Skerratt, L.F. (2014) First evidence of Amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) and Ranavirus in Hong Kong amphibian trade. *PLoS ONE*, 9(3), e90750.
- Laufer, G., Canavero, A. Núñez, D. & Maneyro, R. (2008) Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biological Invasions*, 10(7), 1183–1189.
- Lombardo, I., Elgue, E., Villamil, J. & Maneyro, R. (2016) Registro de una población asilvestrada de Rana toro (*Lithobates catesbeianus*) (Amphibia: Anura: Ranidae) en el Departamento de Maldonado, Uruguay. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (2ª época)*, 25 (en prensa).
- Mazzoni, R. (2001) *Ranicultura. Manual básico para inversores. Proyecto Ranicultura DINARA/IIP*. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, 20 p.
- Mazzoni, R. & Carnevia, D. (1996) Análisis de la situación y perspectivas de la ranicultura en Uruguay. *Boletín del Instituto de Investigaciones Pesqueras, Facultad de Veterinaria*, 13, 5–18.
- Mazzoni, R., Cunningham, A.A., Daszak, P., Apolo, A., Perdomo, E., Speranza, G. (2003) Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 995–998.
- Measey, G.J., Rödder, D., Green, S.L., Kobayashi, R., Lillo, F., Lobos, G., Rebelo, R. & Thirion, J.M. (2012) Ongoing invasions of the African clawed frog, *Xenopus laevis*: a global review. *Biological Invasions*, 14(11), 2255–2270.
- Murray, K., Skerratt, L., Marantelli, G., Berger, L., Hunter, D., Mahony, M. & Hines, H. (2011) *Hygiene protocols for the control of diseases in Australian frogs. A report for the Australian Government Department of Sustainability, Environment, Water, Population and Communities*, 26 p.
- Nichols, D.K., Pessier, A.P. & Longcore, J.E. (1998) Cutaneous chytridiomycosis in amphibians: an emerging disease? *Proceedings of the 1998 Annual Conference of the American Association of Zoo Veterinarians*, pp. 269–271.
- Nori, J., Akmentins, M.S., Ghirardi, R., Frutos, N. & Leynaud, G.C. (2011) American bullfrog invasion in Argentina: where should we take urgent measures? *Biodiversity and Conservation*, 20, 1125–1132.
- Prestridge, H.L., Fitzgerald, L.A. & Hibbitts, T.J. (2011) Trade in non-native amphibians and reptiles in Texas: lessons for better monitoring and implications for species introduction. *Herpetological Conservation and Biology*, 6(3), 324–339.
- Rodgers, C.J., Mohan, C.V. & Peeler, E.J. (2011) The



- spread of pathogens through trade in aquatic animals and their products. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 30(1), 241–256.
- Schlaepfer, M.A., Hoover, C. & Dodd, K.D. Jr (2005) Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *Bioscience*, 55, 256–264.
- Schloegel, L.M., Picco, A.M., Kilpatrick, A.M., Davies, A.J., Hyatt, A.D. & Daszak, P. (2009) Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Biological Conservation*, 142, 1420–1426.
- Schloegel, L.M., Ferreira, C. M., James, T.Y., Hipolito, M., Longcore, J.E., Hyatt, A.D., Yabsley, M., Martins, A.M.C.R.P.F., Mazzoni, R., Davies, A.J. & Daszak, P. (2010) The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. *Animal Conservation*, 13 (Suppl. 1), 1–9.
- Shapiro, H.A. & Zwarenstein, H. (1934) A rapid test for pregnancy on *Xenopus laevis*. *Nature*, 133, 762.
- Solís, R., Lobos, G., Walker, S.F., Fisher, M. & Bosch, J. (2010) Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in feral populations of *Xenopus laevis* in Chile. *Biological Invasions*, 12(6), 1641–1646.
- Spinetti, M. (2003) Acuicultura: emprendimiento y producción 2000-2001. En: *Informe Sectorial Pesquero 2000-2201*. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos, DINARA/MGAP. Montevideo, pp. 14–17.
- Une, Y., Kadokaru, S., Tamukai, K., Goka, K. & Kuroki, T. (2008) First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 82(2), 157–160.
- Vizotto, L.D. (1984) Ranicultura. *Ciência e Cultura*, 36(1), 42–45.
- Vredenburg, V.T., Felt, S.A., Morgan, E.C., McNally, S.V.G., Wilson, S. & Green, S.L. (2013) Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Xenopus* Collected in Africa (1871–2000) and in California (2001–2010). *PLoS ONE*, 8(5), e63791.
- Weldon, C., du Preez, L.H., Hyatt, A.D., Muller, R. & Speare, R. (2004) Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2100–2105.
- Winters, H.D., Albertini, K.M., Neely, L.E. & Takahashi, M.K. (2014) Prevalence of the amphibian chytrid fungus among zoo and pet store collections in the northeastern United States. *Herpetological Review*, 45(2), 242–244.

## Haplotipos de *Batrachochytrium dendrobatidis*

### Resumen

Se estudió la diversidad de haplotipos para un fragmento de la región ITS de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), en poblaciones de anfibios nativas y exóticas. Se encontraron tres haplotipos pertenecientes a la cepa patogénica global *Bd*GPL, y no se identificaron cepas nativas. Los tres haplotipos se obtuvieron a partir de especies nativas de anfibios, y uno solo de ellos se identificó en tres especies introducidas, la Rana toro norteamericana *Lithobates catesbeianus*, *Xenopus laevis* y *Ceratophrys ornata*. La mayor diversidad de haplotipos en especies nativas se contrapone a la hipótesis de introducción de *Bd* por *L. catesbeianus*, especie introducida en numerosas regiones por el mercado internacional de anfibios. Estos hallazgos están de acuerdo con muestreos retrospectivos realizados en la costa Atlántica de Brasil, donde es endémica la presencia del linaje nativo *Bd*-Brazil y de *Bd*GPL.

## Introducción

Los primeros trabajos sobre genética de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) encontraron poca variabilidad, lo cual resultaba compatible con un patógeno emergente experimentando una reciente expansión en su rango de distribución (Morehouse *et al.* 2003; Morgan *et al.* 2007). El hallazgo hace poco más de una década de *Bd* en un ejemplar del anuro *Xenopus laevis* colectado en Sudáfrica en 1938 hacía pensar que el origen de este patógeno en otros continentes podría ser a partir de anfibios exportados desde el sur del continente africano (Weldon *et al.* 2004). Esta dispersión global podía llegar a explicarse por el hecho de que *X. laevis* fue intensamente comercializado internacionalmente desde fines del siglo XIX (ver Introducción del Capítulo 4). Los hallazgos más viejos de infección por *Bd* en ejemplares de museo de otras partes del mundo eran hasta hace poco mucho más recientes, por ejemplo 1961 EEUU, 1978 Australia, 1983 Centroamérica, 1980 Sudamérica, 1997 Europa (Bosch *et al.* 2001; Bonaccorso *et al.* 2003; Weldon *et al.* 2004).

Otros hallazgos de infección por *Bd* en África en un ejemplares de museo de varias especies del género *Xenopus* colectados durante los años 1930s y 1940s (Soto-Azat *et al.* 2009; Vredenburg *et al.* 2013), reforzaban la idea del origen africano de *Bd*. Sin embargo, Goka *et al.* (2009) publican el hallazgo en Japón de numerosos haplotipos correspondientes a una región del gen 18S de ARNr de *Bd*, y en base a esta mayor variabilidad genética sugieren a Japón como posible origen del patógeno. Los autores citan además la observación de *Bd* en un ejemplar de la salamandra *Andrias japonicus* colectado en 1902.

Estudios recientes sobre genética de *Bd* basados en secuencias del genoma completo encontraron la existencia de una mayor variabilidad, y una compleja historia evolutiva de este patógeno. Se ha sugerido que *Bd* sería endémico de algunas áreas y un patógeno nuevo en otras, y se han identificaron varios linajes principales, el panzoótico global “*Bd*GPL”, del Cabo “*Bd*Cape”, Suizo “*Bd*CH”, de Corea “*Bd*-Korea” y “*Bd*-Brazil” (Farrer *et al.* 2011; Schloegel *et al.* 2012; Bataille *et al.* 2013; Rosenblum *et al.* 2013). Rodríguez *et al.* (2014) estudiaron la dinámica espacio-temporal de *Bd* en anfibios de la Mata Atlántica, encontrando casos de infección a partir desde 1894 y que *Bd*GPL y *Bd*-Brazil han estado presentes en anfibios de Brasil al menos desde 1897 y 1916 respectivamente, previo a la introducción de anfibios exóticos en dicho país. Al momento, los datos disponibles sobre caracterización genética de *Bd* en Brasil son los únicos para Sudamérica.

En Uruguay, los casos más viejos de infección por *Bd* se detectaron en un criadero comercial de Rana toro del sur del país durante un episodio de mortalidad de metamorfos en 1999 (Mazzoni *et al.* 2003). En especies nativas los casos más viejos corresponden a larvas de *Physalaemus henselii* colectadas el año 2001 en Pueblo Madera, norte de Uruguay (Borteiro *et al.* 2009). En esta sección se investiga la diversidad de haplotipos de *Bd* presentes en el país tanto en ejemplares de especies nativas como introducidas, con el fin de testar la hipótesis del patógeno nuevo.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Testar la hipótesis del patógeno nuevo en especies nativas de anfibios de Uruguay.

### **Objetivos específicos**

- 1) Identificar los haplotipos correspondientes a un fragmento de la región ITS de *Bd* presentes en especies nativas de anfibios, tanto de hallazgo común como especies en declinación.
- 2) Identificar los correspondientes haplotipos en especies de anfibios introducidos mantenidos en cautiverio y asilvestrados.

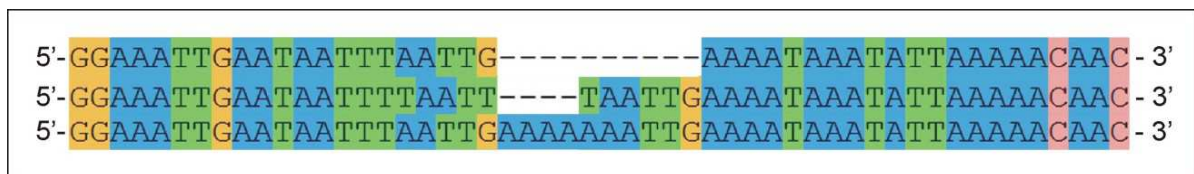
## **Materiales y métodos**

Se estudiaron 34 productos de PCR que resultaron positivos a la amplificación de un fragmento de la región ITS de *Bd*, obtenidos en los estudios de los Capítulos precedentes 4 y 5. Las muestras utilizadas correspondieron a piel conservada en etanol 95 % v/v e hisopados de especies nativas de anfibios e introducidas, tabla 5.1. Dichas muestras fueron purificadas,

secuenciadas en ambos sentidos, y los cromatogramas editados y procesados según se describe en el Capítulo 2.

## Resultados

Las 36 muestras analizadas permitieron obtener 39 secuencias, ya que tres productos de PCR correspondientes a hisopados de un ejemplar de *Physalaemus henselii* (BKT 2670) y dos de *Pleurodema bibroni* (BKT 2700, 3434) produjeron dos secuencias diferentes, una con cada primer. Se identificaron tres haplotipos, indicados como UYI, UYII y UYIII, de 247, 253 y 257 pb respectivamente. Éstos difirieron en una región de 15 pb, situada a partir de la base 56 del fragmento estudiado en sentido 5'–3', figura 5.1

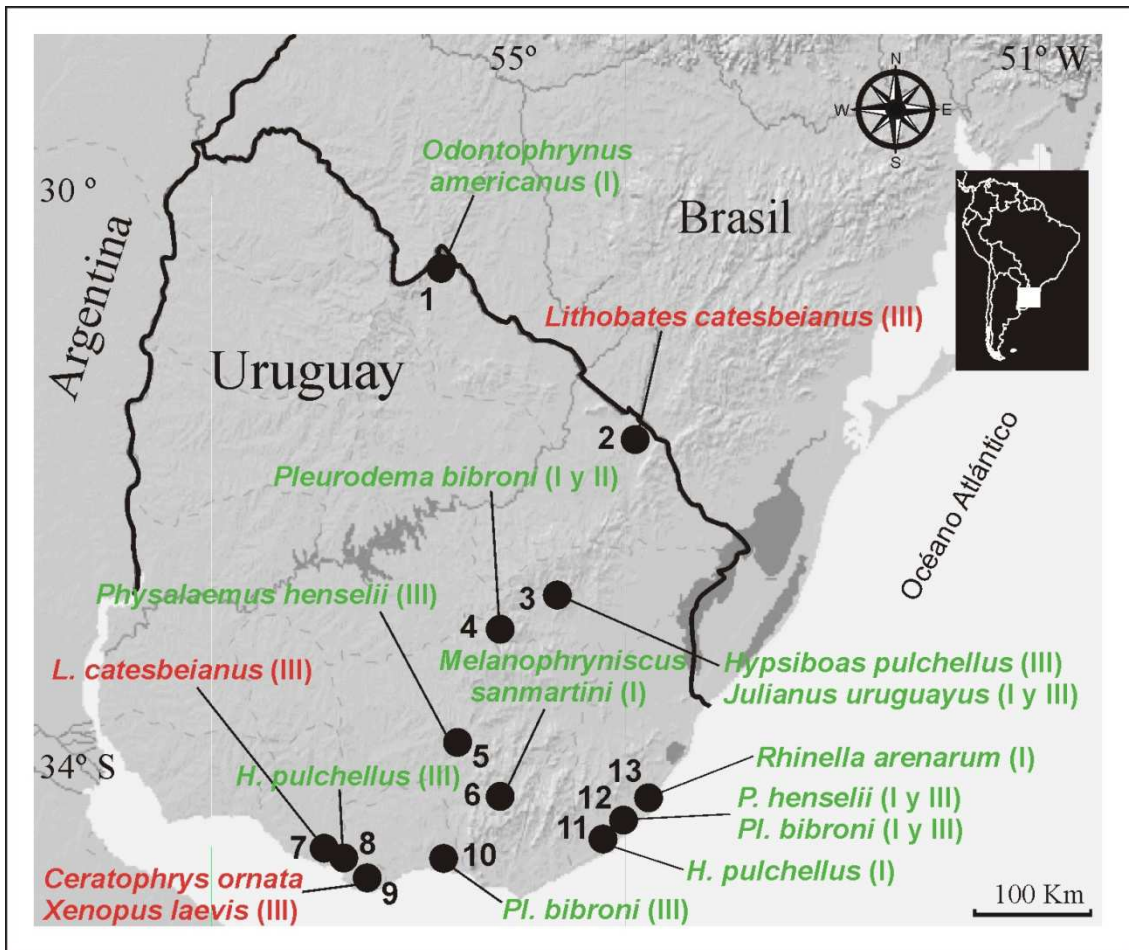


**FIGURA 5.1.** Representación esquemática de las diferencias entre los tres haplotipos de *Batrachochytrium dendrobatidis* identificados en Uruguay. De arriba a abajo UYI, UYII y UYIII.

La mayoría de las secuencias pertenecieron a los haplotipos UYIII (22/36, 61 %) y UYI (13/36, 36 %), ampliamente distribuidos en el país. Este último fue obtenido a partir de muestras de *Hypsiboas pulchellus*, *Physalaemus henselii*, *Pleurodema bibroni*, *Rhinella arenarum*, *Melanophryniscus sanmartini*, *Julianus uruguayus* y *Odontophrynus americanus*. El haplotipo UYII se identificó solamente en un ejemplar de *Pl. bibroni* de Valentines en el centro-este del país. Por su parte, el haplotipo UYIII se identificó en una larva de *H. pulchellus* y en adultos de *P. henselii*, *Pl. bibroni* y *S. uruguayus*. Éste fue además el único haplotipo identificado en las tres especies introducidas estudiadas, *Ceratophrys ornata*, *Xenopus laevis* y *Lithobates catesbeianus*, tanto de criadero como silvestre. Los resultados se resumen en la tabla 5.1, y la distribución geográfica de los haplotipos y sus respectivos hospedadores se indica en la figura 5.2.

**TABLA 5.1.** Origen de las secuencias de la región ITS de *Batrachochytrium dendrobatidis* obtenidas de anfibios de Uruguay. Las muestras corresponden a ejemplares adultos salvo indicación.

Especie	Procedencia	Fecha	Muestra	secuencias	Haplotipo
<i>Ceratophrys ornata</i>	Argentina	X/2013	BKT 3656	1	UyIII
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	La Paloma, Dpto. de Rocha	17/IV/2013	BKT 3553	1	UyI
	Delta del Tigre, Dpto. de San José	8/X/2010	BKT 3084 (larva)	1	UyIII
	Quebrada de los Cuervos, Dpto. de Treinta y Tres	9/X/2012	BKT 3513	1	UyI
<i>Julianus uruguayus</i>	Quebrada de los Cuervos, Dpto. de Treinta y Tres	6/IX/2009	BKT 2773, 2782, 2792	3	UyIII
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Libertad (criadero), Dpto. de San José	16/X/2010	BKT 3088 (n = 7)	7	UyIII
	Aceguá, Dpto. de Cerro Largo	8/XI/2011	BKT 3647, 3649, 3650, 3654	4	UyIII
<i>Melanophryniscus sanmartini</i>	Salto del Penitente, Dpto. de Lavalleja	26/IX/2009	BKT 2710	1	UyI
<i>Odontophrynus americanus</i>	Curticeras, Dpto. de Rivera	7/VII/2009	BKT 2746	1	UyI
<i>Physalaemus henselii</i>	Oceanía del Polonio, Dpto. de Rocha	20/VI/2009	BKT 2654, 2656	2	UyI
		20/VI/2009	BKT 2670	2	UyI, UyIII
	Ruta 7, km 139	5/VII/2009	BKT 2721	1	UyIII
		10/VI/2011	BKT 3268	1	UyIII
	Ruta 10 km 253	21/VI/2009	BKT 2666	1	UyIII
<i>Pleurodema bibroni</i>	Oceanía del Polonio, Dpto. de Rocha	21/VI/2009	BKT 2677, 2678, 2706	3	UyI
		21/VI/2009	BKT 2700	2	UyI, UyIII
	Valentines, Dpto. de Treinta y Tres	15/VI/2012	BKT 3434	2	UyI, UyII
	Jaureguiberry, Dpto. de Canelones	16/VI/2012	BKT 3465_1, _3, _14	3	UyIII
<i>Rhinella arenarum</i>	Barra de Valizas, Dpto. de Rocha	8/I/2006	BKT 656	1	UyI
<i>Xenopus laevis</i>	Montevideo (acuuario), Dpto. de Montevideo	13/VII/2011	BKT 3291	1	UyIII



**FIGURA 5.2.** Distribución geográfica y hospedadores de los haplotipos de *Batrachochytrium dendrobatidis* identificados en Uruguay en este estudio (I-III, ver texto). En rojo se indican hospedadores introducidos. Localidades: 1, Curticeras; 2, Aceguá; 3, Quebrada de los Cuervos; 4, Valentines; 5, Ruta 7 km 139; 6, Salto del Penitente; 7, Libertad; 8, Delta del Tigre; 9, Montevideo; 10, Jaureguiberry; 11, La Paloma; 12, Oceanía del Polonio; 13, Barra de Valizas.

## Discusión

El nivel de resolución del presente estudio permite establecer correspondencias de los tres haplotipos de *Bd* identificados en Uruguay con los distintos linajes de este hongo caracterizados previamente, pero no es posible identificar con exactitud la cepa. Los tres haplotipos (UYI-III) pertenecen al linaje patogénico global *Bd*GLP, y no se detectaron cepas nativas de Sudamérica como las presentes en Mata Atlántica (*Bd*-Brazil).

La secuencia del haplotipo UYI fue idéntica a la de las regiones homólogas de los haplotipos E de Goka *et al.* (2009; # acceso a GenBank AB435214), CN12 de Bai *et al.*

(2012; #JN870743), y el haplotipo D reportado por Schloegel *et al.* (2012; #JQ582906) correspondiente a la cepa CW34 aislada a partir de *Xenopus laevis* de Sudáfrica. El primero fue identificado en *Lithobates catesbeianus* silvestre de Japón y ejemplares de anfibios introducidos al mercado de animales de compañía de dicho país (*Ceratophrys cranwelli*, *Glandirana rugosa* y *Litoria caerulea*). En forma similar, el haplotipo CN12 de Bai *et al.* (2012) fue encontrado en anfibios nativos de China y en las especies introducidas *L. catesbeianus* y *X. laevis*.

La secuencia del haplotipo UYII se corresponde exactamente con las regiones homólogas del haplotipo L de Goka *et al.* (2009; #AB435221) identificado en *Lithobates catesbeianus* de Japón, de los haplotipos A, B, N, O y S de la cepa CW34 (Schloegel *et al.* 2012; #JQ582924, JQ582926, JQ582929, JQ582928 y JQ582920 respectivamente) y del haplotipo E de la cepa JEL423 (ver material suplementario de Schloegel *et al.* 2012). Por su parte la secuencia de UYIII fue idéntica a la de regiones homólogas de numerosas secuencias disponibles en GenBank: EU779863, FJ373884, FJ232008, FJ232010–FJ232013, FJ232015–FJ232018 (Gaertner *et al.*, no publicado), AY997031 (cepa JEL197, James *et al.* 2006), FJ010547–FJ010560 (Federici *et al.* 2008), AB435211 (haplotipo JAPAN-A, Goka *et al.* 2009), FJ229469, FJ229470 (Rodríguez *et al.* 2009), HQ176491, HQ176492 (Tupper *et al.* 2011), JQ582942, haplotipos G, J, T y P de la cepa CW34, A, B, C, F, H, J y L de la cepa JAM81, y A, B, F e I de la cepa JEL423 (ver material suplementario de Schloegel *et al.* 2012). Si bien los tres haplotipos de Uruguay pertenecen al linaje *Bd*GPL, solamente UYIII fue identificado en las especies introducidas *Ceratophrys ornata*, *Lithobates catesbeianus* y *Xenopus laevis*, que presentan una dispersión global debida al tráfico internacional de anfibios.

Los posibles orígenes africano y asiático de las cepas de *Bd* (Weldon *et al.* 2004; Goka *et al.* 2009) son cuestionados recientemente por Rodríguez *et al.* (2014). Estos autores encuentran que tanto *Bd*GPL como cepas nativas del linaje *Bd*-Brazil estaban presentes en el bioma Mata Atlántica desde hace más de 100 años. Indican además que el caso más viejo de infección por *Bd* en anfibios nativos corresponde a un ejemplar de *Hypsiboas pulchellus* colectado en 1894 en el estado de Rio Grande do Sul, cerca de Uruguay. Esto hace suponer de la existencia de *Bd* en anfibios nativos de Uruguay mucho antes de la introducción de *Lithobates catesbeianus* y *Xenopus laevis* a la región. Recientemente Becker *et al.* (2016) publican casos de infección por *Bd* en la cuenca amazónica, registrados en ejemplares colectados a partir del año 1895.

En el presente estudio, si bien el número de secuencias obtenidas a partir de anuros introducidos fue menor con respecto a especies nativas, la mayor diversidad de haplotipos



observada en estas últimas es coherente con la hipótesis del patógeno endémico para explicar la dinámica de infección por *Bd*, como se ha propuesto para la Mata Atlántica (Rodríguez *et al.* 2014). De todas formas, el nivel de discriminación de la diversidad genética de *Bd* aquí alcanzado no permite descartar la introducción de nuevas cepas de *Bd* por parte de Rana toro y otras especies (ej. JAM81).

La Rana toro es considerada un portador asintomático de *Bd* (Daszak *et al.* 2004), con una susceptibilidad variable a distintas cepas lo cual puede influir en su respuesta al patógeno y en su rol como vector (Gervasi *et al.* 2013). El criadero activo muestreado sufrió en 1999 la pérdida de 28000 metamorfos en menos de un mes (> 90 %), que estaban afectados por quitridiomycosis (Mazzoni *et al.* 2003). Rodríguez *et al.* (2014) plantearon que esta elevada mortalidad podría deberse a cepas nativas de *Bd*. Mazzoni *et al.* (2003) mencionan que especies nativas (“tree frogs”; probablemente *Scinax granulatus* e *Hypsiboas pulchellus*) se observaron en las instalaciones del criadero. Sin embargo, en el presente estudio no se detectaron cepas nativas. Como señalan Mazzoni *et al.* (2003), el episodio de mortalidad pudo tener origen en factores ambientales ya que ocurrió a principios del invierno (mayo), con el comienzo de bajas temperaturas, en un rango óptimo para el desarrollo de *Bd* (~ 17 °C).

## Referencias

- Bai, C., Liu, X., Fisher, M.C., Garner, T.W.J. & Li, Y. (2012) Global and endemic Asian lineages of the emerging pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* widely infect amphibians in China. *Diversity and Distributions*, 18(3), 307–318.
- Bataille, A., Fong, J.J., Cha, M., Wogan, G.O.U., Baek, H.J., Lee, H., Min, M. & Waldman, B. (2013) Genetic evidence for a high diversity and wide distribution of endemic strains of the pathogenic chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in wild Asian amphibians. *Molecular Ecology*, 22(16), 4196–4209.
- Becker, C.G., Rodríguez, D., Lambertini, C., Toledo, L.F. & Haddad, C.F.B. (2016) Historical dynamics of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amazonia. *Ecography*, DOI: 10.1111/ecog.0205538.
- Bonaccorso, E., Guayasamin, J.M., Méndez, D. & Speare, R. (2003) Chytridiomycosis in a Venezuelan amphibian (Bufonidae: *Atelopus cruciger*). *Herpetological Review*, 34(4), 331–334.
- Borteiro, C., Aramburu, A., Kolenc, F. & Cruz, J.C. (2009) Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84(2), 159–162.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I. & García-París, M. (2001) Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*, 97(3), 331–337.

- Daszak, P., Strieby, A., Cunningham, A.A., Longcore, J.E., Brown, C.C. & Porter, D. (2004) Experimental evidence that the Bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetological Journal*, 14(4), 201–207.
- Farrer, R.A., Weinert, L.A., Bielby, J., Garner, T.W.J., Balloux, F., Clare, F., Bosch, J., Cunningham, A.A., Weldon, C., du Preez, L.H., Anderson, L., Kosakovsy Pond, S.L., Shahar-Golan, R., Henk, D.A. & Fisher, M.C. (2011) Multiple emergences of genetically diverse amphibian infecting chytrids include a globalized hypervirulent recombinant lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 108(46), 18732–18736.
- Federici, S., Clemenzi, S., Favelli, M., Tessa, G., Andreone, F., Casiraghi, M. & Crottini, A. (2008) Identification of the pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations of a plain area in the Northwest of Italy. *Herpetology Notes*, 1, 33–37.
- Gervasi, S.S., Urbina, J., Hua, J., Chestnut, T., Relyea, R.A. Blaustein, A.R. (2013) Experimental evidence for American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) susceptibility to chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth*, 10(2), 166–171.
- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Susuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T. & Hyatt, A. (2009) Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18(23), 4757–4774.
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E., Porter, D., Powell, M.J., Griffith, G.W. & Vilgalys, R. (2006) A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98(6), 860–871.
- Mazzoni, R., Cunningham, A.A., Daszak, P., Apolo, A., Perdomo, E., Speranza, G. (2003) Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 995–998.
- Morehouse, E.A., James, T.Y., Ganley, A.R.D., Vilgalys, R., Berger, L., Murphy, P.J. & Longcore, J.E. (2003) Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology*, 12(2), 395–403.
- Morgan, J.A.T., Vredenburg, V.T., Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., Sice, M.J., Tunstall, T., Bingham, R.E., Parker, J.M., Longcore, J.E., Moritz, C., Briggs, C.J. & Taylor, J.W. (2007) Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 104(34), 13845–13850.
- Rodriguez, E.M., Gamble, T., Hirt, M.V. & Cotner, S. (2009) Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* at the Headwaters of the Mississippi River, Itasca State Park, Minnesota, USA. *Herpetological Review*, 40(1), 48–50.
- Rodriguez, D., Becker, C.G., Pupin, N.C., Haddad, C.F.B. & Zamudio, K.R. (2014) Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Molecular Ecology*, 23(4), 774–787.
- Rosenblum, E.B., James, T.Y., Zamudio, K.R., Poorten, T.J., Ilut, D., Rodriguez, D., Eastman, J.M., Richards-Hrdlicka, K., Joneson, S., Jenkinson, T.S., Longcore, J.E., Parra Olea, G., Toledo, L.F., Arellano, M.L., Medina, E.M., Restrepo, S., Flechas, S.V., Berger, L., Briggs, C.J. & Stajich, J.E. (2013) Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed

- with genome resequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 110(23), 9385–9390.
- Schloegel, L.M., Toledo, L.F., Longcore, J.E., Greenspan, S.E., Vieira, C.A., Lee, M., Zhao, S., Wangen, C., Ferreira, C.M., Hipolito, M., Davies, A.J., Cuomo, C.A., Daszak, P. & James, T.Y. (2012) Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, 21(21), 5162–5177.
- Soto-Azat, C., Clarke, B.T., Poynton, J.C. & Cunningham, A.A. (2009) Widespread historical presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in African pipid frogs. *Diversity and Distributions*, 16(1), 126–131.
- Tupper, T.A., Streicher, J.W., Greenspan, S.A., Timm, B. C. & Cook, R.P. (2011) Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in anurans of Cape Cod National Seashore, Barnstable County, Massachusetts, USA. *Herpetological Review* 42(1), 62–65.
- Vredenburg, V.T., Felt, S.A., Morgan, E.C., McNally, S.V.G., Wilson, S. & Green, S.L. (2013) Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Xenopus* Collected in Africa (1871–2000) and in California (2001–2010). *PLoS ONE*, 8(5), e63791.
- Weldon, C., du Preez, L.H., Hyatt, A.D., Muller, R. & Speare, R. (2004) Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2100–2105.

# III

## ENFERMEDADES CAUSADAS POR ICHTHYOSPOREA

*And the method by which the parasite succeeds in infecting fresh hosts  
must remain for the present a complete mystery.*

E.A. Minchin & H.B. Fantham, 1905

---

Parte de los resultados de esta sección fueron publicados en el transcurso de este estudio (ver Apéndice 9):

Borteiro, C., Cruz, J.C., Kolenc, F., Verdes, J.M., Moraña, A., Martínez Debat, C., Kun, A., Ubilla, M. & Okada, K. (2014) Dermocystid-chytrid coinfection in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *Journal of Wildlife Diseases*, 50(1), 150–153.

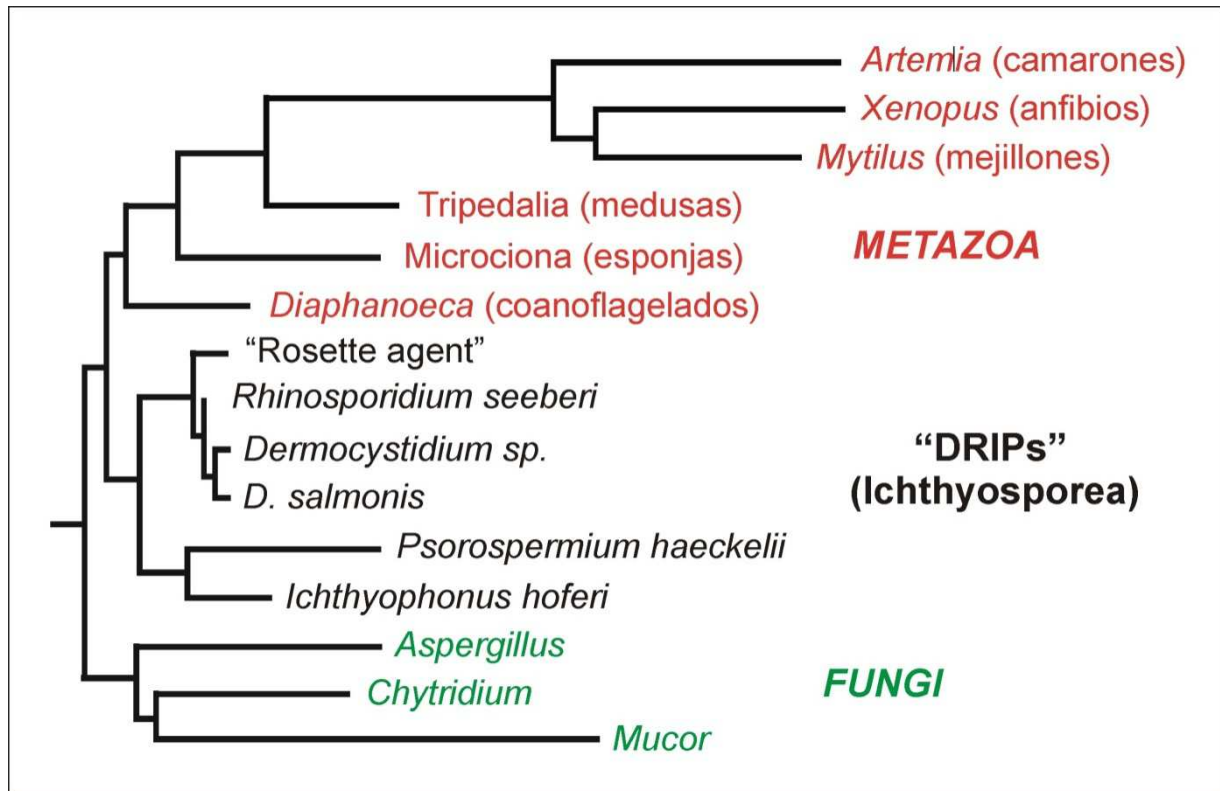
Borteiro, C., Verdes, J.M., Cruz, J.C., Sabalsagaray, M.J., Kolenc, F., Martínez Debat, C. & Ubilla, M. (2015) *Ichthyophonus* sp. (Ichthyophonae, Ichthyophonida) infection in a South American amphibian, the hylid frog *Hypsiboas pulchellus*. *Journal Wildlife Diseases*, 51(2), 530–533.

Los organismos pertenecientes a la Clase Ichthyosporea son eucariotas unicelulares que producen endosporas, cuya taxonomía y relaciones filogenéticas han sido controversiales desde su descubrimiento hace más de un siglo. Históricamente se los ha relacionado con diversos grupos de eucariotas, principalmente hongos, y también procariotas (ver Vilela & Mendoza 2012). Las especies conocidas son parásitos, mutualistas o simbioses de vertebrados e invertebrados, fundamentalmente acuáticos (Mendoza *et al.* 2002; Glockling *et al.* 2013). En vertebrados terrestres la parasitosis se asocia al contacto directo con cuerpos de agua dulce (Arseculeratne & Mendoza 2005).

La monofilia de Ichthyosporea fue propuesta inicialmente por Ragan *et al.* (1996) para un pequeño grupo de estos microorganismos denominado “DRIPs”, sigla que hace referencia al género *Dermocystidium*, el “rosette agent” patógeno de peces (actualmente *Sphaerothecum destruens*, Arkush *et al.* 2003), *Ichthyophonus* y *Psorospermium*. Dado que el DRIP incluía numerosos parásitos de peces, se le asignó a una nueva Clase llamada Ichthyosporea (Cavalier-Smith 1998). La afinidad entre patógenos de peces del género *Dermocystidium* y *Rhinosporidium* parásito de aves y mamíferos había sido sugerida tempranamente por Dunkerly (1914). Herr *et al.* (1999) son quienes confirman más tarde una cercana relación filogenética entre *Rhinosporidium* y el DRIP basándose en caracteres moleculares.

La Clase Ichthyosporea, incluye dos Órdenes, Dermocystida y Eccrinida (Ruggiero *et al.* 2015), con numerosos taxones parásitos de anfibios y peces (ej. *Anurofeca*, *Ichthyophonus*; ver Glockling *et al.* 2013). Estos organismos fueron llamados también Mesomycetozoea debido a su cercana relación con los hongos y los animales (Herr *et al.* 1999; Mendoza *et al.* 2001). Sus relaciones filogenéticas se muestran en la figura III-1.

El conocimiento sobre la ecología de este grupo es aún muy incompleto, y los ciclos biológicos de la gran mayoría de las especies parásitas son insuficientemente conocidos (Mendoza *et al.* 2002). Éstas se asocian generalmente a una sola especie de hospedador, desconociéndose los mecanismos de propagación en un mismo organismo hospedador y la transmisión a hospedadores no infectados (Glockling *et al.* 2013). Todas las formas parásitas descritas producen endosporas y algunas además esporas flageladas o “amebas” (Mendoza *et al.* 2002).



**FIGURA III.1.** Representación esquemática parcial de las relaciones filogenéticas del DRIP (Ichthyosporea), adaptado de Fredericks *et al.* (2000).

## Referencias

- Arkush, K.D., Mendoza, L., Adkison, M.A. & Hedrick, R.P. (2003) Observations on the life stages of *Sphaerothecurn destruens* n. g., n. sp., a mesomycetozoean fish pathogen formally referred to as the Rosette Agent. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(6), 430–438.
- Arseculeratne, S.N. & Mendoza, L. (2005) *Rhinosporidium seeberi*. Chapter 26. En: *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10<sup>ma</sup> ed., John Wiley & Sons.
- Cavalier-Smith, T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73, 203–266.
- Dunkerly, J.S. (1914) *Dermocystidium pusula* Pérez, parasitic on *Trutta fario*. *Zoologischer Anzeiger*, 44, 179–182.
- Fredericks, D.N., Jolley, J.A., Lepp, P.W., Kosek, J.C. & Relman, D.A. (2000) *Rhinosporidium seeberi*: a human pathogen from a novel group of aquatic protistan parasites. *Emerging Infectious Diseases*, 6(3), 273–282.
- Glockling, S.L., Marshall, W.L. & Gleason, F.H. (2013) Phylogenetic interpretations and ecological potentials of the Mesomycetozoea (Ichthyosporea). *Fungal Ecology*, 6(4), 237–247.
- Herr, R.A., Ajello, L., Taylor, J.W., Arseculeratne, S.N. & Mendoza, L. (1999) Phylogenetic analysis of *Rhinosporidium seeberi*'s 18S small-subunit ribosomal DNA groups this pathogen

- among members of the Protoctistan Mesomycetozoa Clade. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), 2750–2754.
- Mendoza, L., Ajello, L. & Taylor, J.W. (2001) The taxonomic status of *Lacazia loboi* and *Rhinosporidium seeberi* has been finally resolved with the use of molecular tools. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18(3), 95–98.
- Mendoza, L., Taylor, J.W. & Ajello, L. (2002) The Class Mesomycetozoea: a heterogeneous group of microorganisms at the Animal-Fungal boundary. *Annual Review of Microbiology*, 56, 315–344.
- Ragan, M.A., Goggin, C.L., Cawthorn, R.J., Cerenius, L., Jamieson, A.V.C., Plourde, S.M., Rand, T.G. & Gutell, R.R. (1996) A novel clade of protistan parasites near the animal-fungal divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 93(21), 11907–11912.
- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D. & Kirk, P.M. (2015) A higher level classification of all living organisms. *PLoS One*, 10, e0119248.
- Vilela, R. & Mendoza, L. (2012) The taxonomy and phylogenetics of the human and animal pathogen *Rhinosporidium seeberi*: A critical review. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(4), 185–199.

## Dermocistidiosis en anfibios de Uruguay y sur de Brasil: nuevos casos y revisión taxonómica de Dermocystida

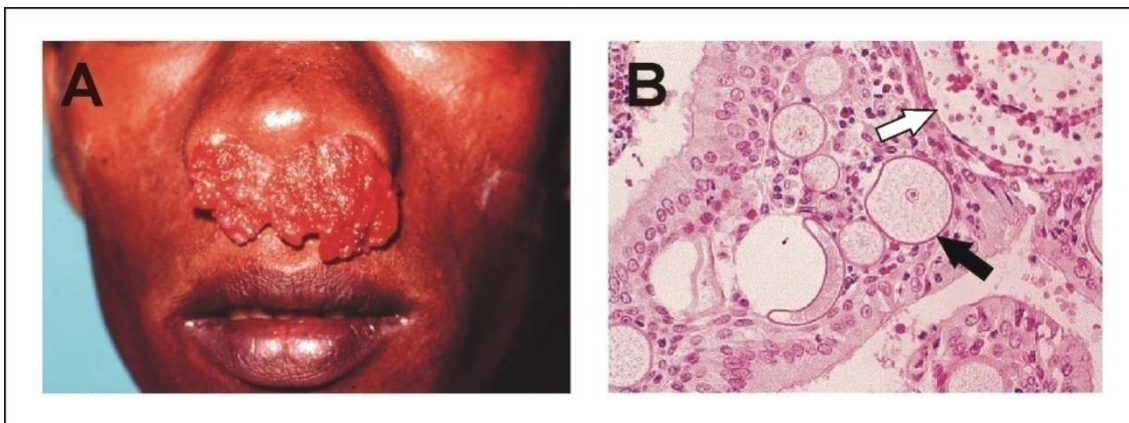
### Resumen

Los microorganismos del Orden Dermocystida (Ichthyosporrea) son parásitos de vertebrados, conocidos inicialmente por *Rhinosporidium seeberi*, patógeno de aves y mamíferos. Numerosos géneros parásitos de anfibios y peces se conocen de Europa y Norteamérica (*Amphibiocystidium*, *Amphibiothecum*, *Dermocystidium*, *Hepatosphera*, *Sphaerothecum*), y solamente se ha descrito una forma parásita de anfibios neotropicales (*Dermosporidium hylarum*). Esta última es considerada actualmente como un sinónimo de *R. seeberi*. En este Capítulo se presentan nuevos casos en anuros de Uruguay y sureste de Brasil, y un análisis filogenético de Dermocystida utilizando secuencias del gen 18S. Se observó que las especies parásitas de anfibios no conforman un grupo natural, y el salto entre hospedadores anfibios y peces parece haber ocurrido más de una vez en la historia evolutiva de Dermocystida. Se propone un nuevo ordenamiento taxonómico en Dermocystida, sinonimizando *Amphibiocystidium* con *Rhinosporidium*, y proponiendo como válido el género *Dermocystidium*. La forma *Dermosporidium hylarum* es redescubierta, y revalidada en *Rhinosporidium*. Otras dos especies son identificadas, parásitos de *Hypsiboas pulchellus* en Uruguay y *Scinax fuscovarius* en São Paulo, Brasil. La primera corresponde a *Rhinosporidium rwandae* recientemente descrito de África tropical. La segunda es una nueva especie del género *Sphaerothecum*, bien diferenciada de *Sphaerothecum destruens*, previamente conocido del hemisferio norte. El hallazgo de *R. rwandae* en *H. pulchellus* parece corresponder a un caso de dispersión natural transoceánica.



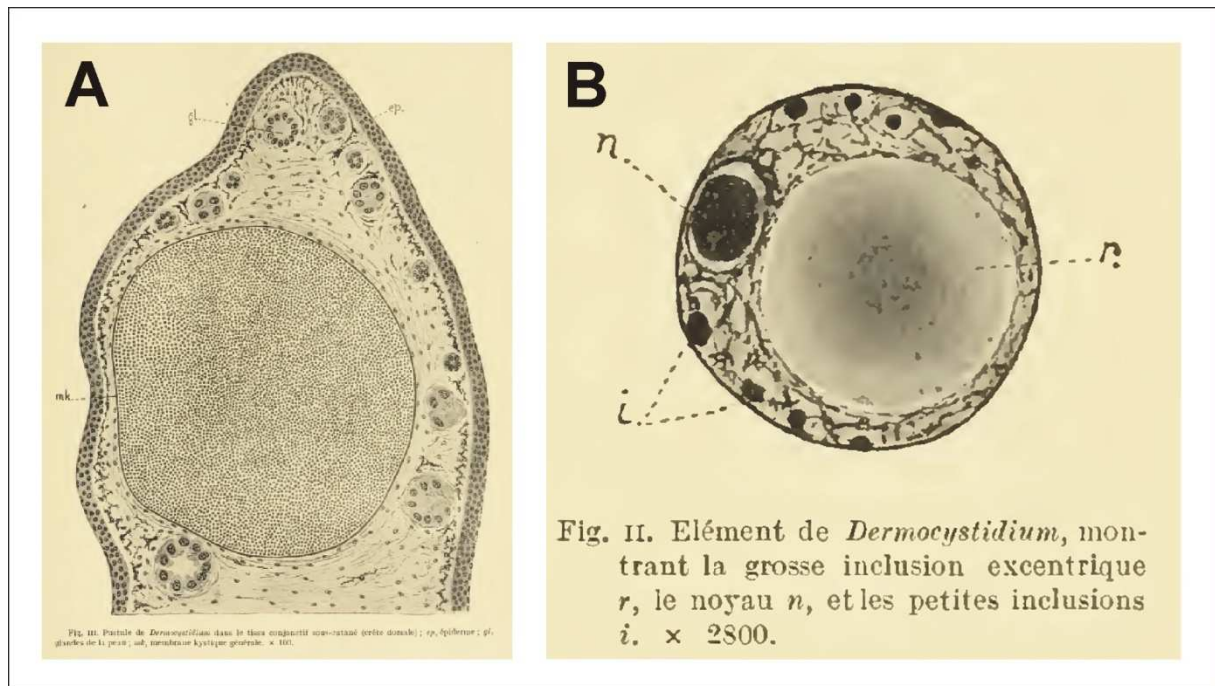
## Introducción

Los parásitos unicelulares del Orden Dermocystida (Ichthyosporea) provocan usualmente una enfermedad nodular granulomatosa de piel y mucosas en vertebrados acuáticos o que tienen contacto con el medio acuático (Vilela & Mendoza 2012). Estos parásitos son patógenos de importancia tanto en medicina humana como veterinaria por causar una enfermedad crónica, potencialmente letal (Arseculeratne & Mendoza 2005; Rowley *et al.* 2013). Entre las especies más relevantes se encuentra *Rhinosporidium seeberi* que afecta aves y otros mamíferos, incluido el hombre (Ramachandra Rao *et al.* 1975; Kennedy *et al.* 1995; Arseculeratne & Mendoza 2005), figura 6.1. La rinosporidiosis humana fue la primera enfermedad identificada entre las causadas por Dermocystida (Seeber 1900).



**FIGURA 6.1.** Infección por *Rhinosporidium seeberi* en humanos. **A**, granuloma obstruyendo las narinas, foto gentileza de Sarath N. Arseculeratne y Leonel Mendoza. **B**, corte histológico de un granuloma causado con numerosos esporangios en desarrollo (flecha negra) y un esporangio maduro con endosporas (flecha blanca), foto gentileza de Leonel Mendoza.

Poco tiempo después de los primeros diagnósticos en humanos se describen enfermedades similares en anfibios y peces, en los que la infección se presenta como una afección nodular y ulcerativa de la piel y branquias (Pérez 1907; 1913; Dunkerly 1914), figura 6.2. En estos vertebrados acuáticos los dermocistidios pueden tener fuerte impacto a nivel poblacional, con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (Raffel *et al.* 2008; Rowley *et al.* 2013).



**FIGURA 6.2.** Infección por *Dermocystidium pusula*, adaptado de Pérez (1913). **A**, corte histológico de un nódulo en piel con un esporangio subcutáneo repleto de endosporas. **B**, ilustración de la endospora donde se señala una gran inclusión excéntrica (*r*), el núcleo (*n*) y pequeñas inclusiones (*i*).

Los trabajos sobre dermocistidios de anfibios continuaron en años sucesivos principalmente en Europa, con el reporte de nuevos casos de infección y la descripción de especies parásitas de anfibios que son asignadas a los géneros *Dermocystidium* y *Dermomycooides* (Moral 1913; De Beauchamp 1914; Granata 1919; Guyénot & Naville 1922; Poisson 1937). Posteriormente Carini (1940) crea un nuevo género para una especie parásita de anuros hílidos pertenecientes al grupo *ruber* del género *Scinax* ("*Hyla rubra*"), hallados en la zona de Tietê, en el sureste de Brasil. El autor llama a este patógeno *Dermosporidium hylarum*, y lo relaciona con *Rhinosporidium* y *Dermocystidium*, siendo al momento el único reporte de parasitosis por Dermocystida en anfibios neotropicales (Carini 1940). Nuevas especies son luego asignadas a *Dermosporidium*, identificadas en anuros europeos del género *Rana* (Brož & Přívora 1952; Brož & Kulda 1954) y en sapos del género *Anaxyrus* (Bufonidae) de América del Norte (Jay & Pohley 1981).

Al igual que en el caso de los anfibios, numerosas especies de Dermocystida parásitas de peces fueron descritas del hemisferio norte, fundamentalmente en base a caracteres morfológicos y a su ocurrencia en distintos hospedadores. La gran mayoría de ellas fueron incluidas en el género *Dermocystidium* (Léger 1914; Hoshina & Sahara 1950; Elkan 1962;

Červinka & Vítovek 1974; Dykova & Lom 1992; Pekkarinen *et al.* 2003; Feist *et al.* 2004; Hassan *et al.* 2014), y una al género monotípico *Sphaerothecum* (Arkush *et al.* 2003).

En una reciente revisión Pascolini *et al.* (2003) reúnen a las especies parásitas de anfibios en un nuevo género llamado *Amphibiocystidium*. Posteriormente, varios autores realizan estudios filogenéticos en base a caracteres moleculares en los que se confirma el cercano parentesco entre *Amphibiocystidium*, *Dermocystidium* y *Rhinosporidium*, y se propone el género *Amphibiothecum* para *Dermosporidium penneri* de América del Norte (Feldman *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2005). Más recientemente Raffel *et al.* (2008) describen una nueva especie de América del Norte llamada *Amphibiocystidium viridescens*, encontrada en tritones de la especie *Notophthalmus viridescens*. La última especie descrita en anfibios es *Rhinosporidium rwandae*, descubierto en anuros africanos del género *Hyperolius* (Scheid *et al.* 2015). En éstos y otros estudios que utilizan caracteres moleculares *Dermocystidium* y *Amphibiocystidium* no resultan ser taxones monofiléticos (Feldman *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2005; Raffel *et al.* 2008; Vilela & Mendoza 2012; Scheid *et al.* 2015), figura 6.3.

En este Capítulo se presentan nuevos casos de infección por Dermocystida en anfibios de Uruguay y Brasil, junto con una revisión bibliográfica de los dermocistidios parásitos de anfibios. Se realiza además un análisis filogenético molecular de Dermocystida, incluyendo secuencias obtenidas a partir del nuevo material colectado. En base a este análisis se reevalúa el estatus de *Dermosporidium hylarum* y se propone un nuevo ordenamiento taxonómico en Dermocystida.

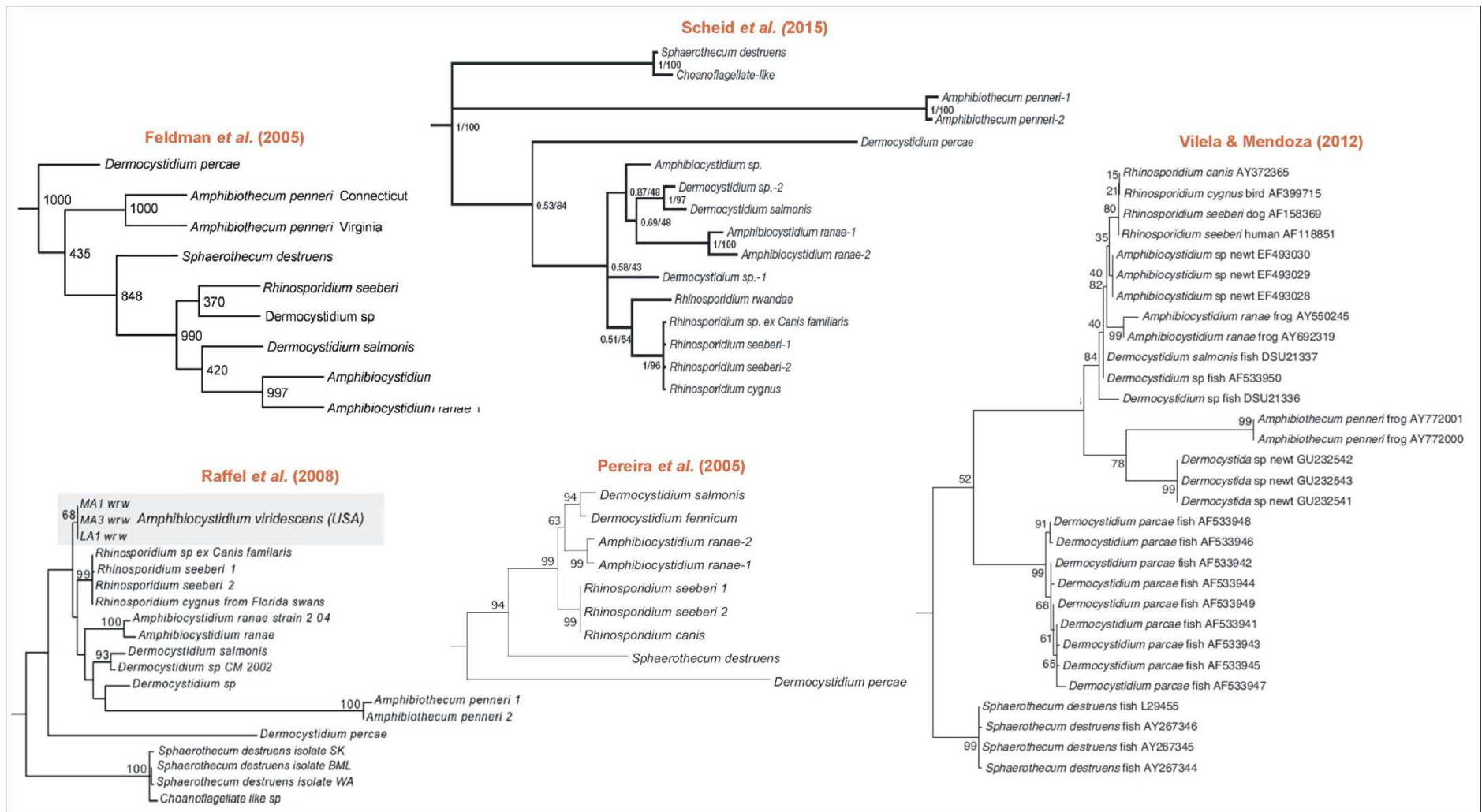


FIGURA 6.3. Árboles más inclusivos en análisis filogenéticos previos del Orden Dermocystida. Adaptado de las ilustraciones originales.

# Objetivos

## Objetivo general

Realizar una revisión taxonómica del Orden Dermocystida en base a un análisis filogenético molecular.

## Objetivos específicos

- 1) Presentar nuevos casos de infección por Dermocystida en anfibios de Uruguay y sureste de Brasil, y estudiar la identidad de los microorganismos involucrados.
- 2) Obtener una aproximación a las relaciones evolutivas en Dermocystida utilizando secuencias del gen 18S, incluyendo nuevos casos en anfibios neotropicales.
- 3) Revisar la clasificación taxonómica de Dermocystida en base al análisis filogenético, principalmente de las especies parásitas de anfibios.
- 4) Reevaluar el estatus taxonómico de *Dermosporidium hylarum* Carini.

# Materiales y Métodos

## Sitios de estudio y colecta de ejemplares

Uruguay. Entre setiembre de 2009 y agosto de 2012 se realizaron colectas de anfibios no sistemáticas en numerosas localidades del centro-este del país. Los sitios de estudio se situaron principalmente en ambientes de serranías de la Cuchilla Grande, y en zonas de arenales costeros del Río de la Plata y costa Atlántica.

Brasil. Durante el período comprendido entre el 29 de octubre y el 4 de noviembre de 2014 se realizaron colectas de anfibios en el estado de São Paulo, en la ciudad de Tietê y alrededores,

localidad tipo de *Dermosporidium hylarum*. Se muestrearon también algunas localidades cercanas en los Municipios de São Carlos y Rio Claro. Los hábitats muestreados correspondieron al bioma Cerrado (Tietê y alrededores) y a mosaicos de Cerrado y Mata Atlántica. Carini (1940) indica como hospedadores de *D. hylarum* a ejemplares del anuro hílido “*Hyla rubra*”, actualmente un complejo de especies en el grupo *ruber* del género *Scinax* (ver Frost 2016). Por este motivo se procuró principalmente la colecta de estos hílidos. Todos los ejemplares colectados (ver Apéndice 2) fueron transportados al laboratorio, sacrificados mediante anestésicos y procesados según se detalla en el Capítulo 2.

## Registro de lesiones y diagnóstico

Todos los especímenes fueron examinados bajo lupa binocular a 10X en busca de lesiones cutáneas compatibles con infección por Dermocystida. En aquellos que presentaron infección cutánea se realizó un examen post-mortem para observar la presencia de lesiones, sin extracción de las vísceras. Los hallazgos patológicos fueron fotografiados con magnificación, y el diagnóstico histopatológico se realizó según procedimientos descriptos en el Capítulo 2.

## Técnicas moleculares

Se utilizaron muestras de esporangios de nódulos cutáneos, disecados bajo lupa binocular, fijados en etanol 95 % v/v y almacenados a -20 °C hasta su procesamiento. Las mismas se obtuvieron de siete ejemplares adultos de *Hypsiboas pulchellus* del sur de Uruguay, provenientes de Valentines (MNHN 9477), Dpto. de Treinta y Tres, y de los alrededores de La Paloma (BKT 3478, 3494, 3553, 3558, MNHN 9478, 9507), Dpto. de Rocha, y dos ejemplares adultos de *Scinax fuscovarius* (Hylidae) de los alrededores de Rio Claro, estado de São Paulo, Brasil (CFBH 39120, 39121). La técnica de extracción de ADN se indicó previamente en el Capítulo 2. Las reacciones de PCR se realizaron en base a dos protocolos. El primero incluyó una desnaturalización inicial de 2 min a 94° C, seguida de 10 ciclos con desnaturalización de 2 min a 94° C, 30 s de “annealing” a 60° C (disminuyendo 1° C en cada ciclo) y 45 s de extensión a 72° C, y luego 30 ciclos con una temperatura de annealing de 50° C y una extensión final de 5 min a 72° C, los cebadores utilizados, específicos de los Ichthyosporea, permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 800 pb del gen 18S ARNr: 18S-EUK581L-F (5'-ATCAACTTTCGRTGGTAAGGTA-3') y 18S-EUK1134-R (5'-

TTTAARKTTCAGCCTTGSG-3') (Raffel *et al.* 2008). El segundo protocolo utilizado consistió de una incubación inicial de 2 min a 94° C, 40 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 55° C y 3 min a 72° C, con 7 min finales a 72° C; las secuencias de los cebadores en este caso fueron las siguientes: 5'-TAAGCCATGCATGTCAAGTATAA-3' y 5'-ACTAGGAATTCCTCGTBAAGATS-3', que producen un fragmento de aproximadamente 1400 pb (Feldman *et al.* 2005). Los resultados de ambas rutinas se analizaron por electroforesis en poliacrilamida (12 %), y algunos productos de PCR se purificaron y secuenciaron en ambos sentidos según se describe en el Capítulo 2. Las secuencias obtenidas se depositaron en GenBank.

## **Análisis genéticos y filogenéticos**

Las secuencias en forma de cromatogramas fueron editadas a ojo con el programa Chromas<sup>®</sup>. Su calidad fue controlada en el programa CLUSTAL X realizando alineamientos con la secuencia EF493028 de *Amphibiocystidium viridescens* (Raffel *et al.* 2008) y eliminando las zonas correspondientes a las secuencias de los cebadores. Para el análisis filogenético se utilizaron secuencias disponibles en GenBank, incluyendo las distintas cepas conocidas de *Rhinosporidium seeberi*. Se utilizaron como grupo externo secuencias de *Capsaspora owczarzaki* (AF436886, Hertel *et al.* 2002) e *Ichthyophonus hoferi* (U43712, Spanggaard *et al.* 1996), y el árbol se enraizó con el hongo *Aspergillus fumigatus* (M60300, Barns *et al.* 1991). El muestreo de Dermocystida se presenta en la tabla 6.1.

El análisis empleó una aproximación de homologías estáticas, con alineamiento a priori de las secuencias con el programa MAFFT v7 (Kato & Standley 2013; disponible en: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Los análisis fueron hechos con programa TNT (Goloboff *et al.* 2008; disponible en: <http://www.cladistics.com/Downloads.html>), que utiliza parsimonia como criterio de optimalidad. Los “gaps” no fueron considerados como un quinto estadio. La estrategia de búsqueda de árboles consistió de 1000 rondas de RAS (“random addition sequence”) + TBR (“tree bisection and reattachment”) guardando hasta 100 árboles por réplica. Como medidas de soporte se emplearon el índice de Bootstrap y la técnica de Jackknife utilizando las rutinas “default” del programa para matrices de datos pequeñas, en el primer caso con búsquedas estándar (sin reemplazo) de 100 réplicas colapsando los árboles por debajo de 1, y en el segundo consideran una probabilidad de remoción para cada carácter de 0,36 y calculando las frecuencias absolutas de cada grupo (Goloboff *et al.* 2008).

**TABLA 6.1.** Muestreo de secuencias del gen 18S obtenidas de GenBank para el análisis filogenético de Dermocystida.

Taxón	Número de acceso en GenBank	Fuente
<i>Amphibiocystidium</i> sp.	EU650666	Di Rosa & Fagotti (no publicado)
<i>Amphibiocystidium</i> sp.	GU232541–GU232543	González-Hernández <i>et al.</i> (2010)
<i>Amphibiocystidium ranae</i>	AY550245, AY692319	Pereira <i>et al.</i> (2005)
<i>Amphibiocystidium viridescens</i>	EF493028–EF493030	Raffel <i>et al.</i> (2008)
<i>Amphibiothecum penneri</i>	AY772000, AY772001	Feldman <i>et al.</i> (2005)
<i>Dermocystidium</i> sp.	U21336	Ragan <i>et al.</i> (1996)
<i>Dermocystidium fennicum</i>	AF533950	Pekkarinen <i>et al.</i> (2003)
<i>Dermocystidium percae</i>	AF533941–AF533949	Pekkarinen <i>et al.</i> (2003)
<i>Dermocystidium salmonis</i>	U21337	Ragan <i>et al.</i> (1996)
<i>Rhinosporidium rwandae</i>	KP172222	Scheid <i>et al.</i> (2015)
<i>Rhinosporidium seeberi</i>	AF118851	Herr <i>et al.</i> (1999)
	AF158369	Fredericks <i>et al.</i> (2000)
	AY372365	Silva <i>et al.</i> (2005)
	AF399715	
	JQ231220	Burgess <i>et al.</i> (2012)
<i>Sphaerothecum destruens</i>	L29455	Kerk <i>et al.</i> (1995)
	AY267344–AY267346	Arkush <i>et al.</i> (2003)

## Resultados

### Revisión taxonómica

***Rhinosporidium*.** La rinosporidiosis fue descrita por Seeber (1900) en un trabajo de tesis para acceder al título de Doctor en Medicina en Buenos Aires, Argentina, bajo la dirección del Prof. R. Wernicke. En el mismo se estudiaron dos casos de afección nasal en humanos, uno de ellos identificado por el Dr. Malbrán en 1892, pero sin adjudicar un nombre al microorganismo. Éste se describe como un patógeno del tejido conjuntivo y aparentemente de reproducción asexual, con esporangios de hasta 230 µm que cuyas esporas maduras miden 7–9 µm. La primera denominación recibida es “*Coccidium seeberia*. – Wernicke, 1900” en el libro *Tratado de Parasitología Animal* de Belou (1903, p. 62), publicado también en Buenos Aires. El mismo es una sugerencia de Wernicke en honor a su alumno (Ashworth 1924), hecha en 1900 y recogida por Belou (1903). Las publicaciones de Seeber (1900) y Belou (1903) pasan varios años inadvertidas para autores del viejo mundo. Minchin y Fantham (1905),



describen entonces casos en humanos de la India, y nombran al microorganismo responsable *Rhinosporidium kinealyi*. La validez de este nombre es cuestionada poco después por Seeber (1912, *fide* Ashworth 1924), quien indica la prioridad de *seeberi*.

Las relaciones taxonómicas de *Rhinosporidium seeberi* fueron durante mucho tiempo inciertas y controversiales hasta tiempos recientes, siendo considerado un protista cercano a diversos grupos de eucariotas e incluso de procariotas. Seeber (1900) lo relaciona a *Coccidioides immitis* causante de la coccidiomicosis, una micosis sistémica de zonas secas de América descubierta en 1892 por Posadas y Wernicke (Negroni 2011). Beattie (1906) lo asocia con los Neosporidia, al igual que Minchin & Fantham (1905) y Ridewood & Fantham (1907) quienes a su vez lo consideran parte de los Haplosporidia, un grupo que incluyó históricamente diversos taxones que se pensaba afines a hongos inferiores (Ashworth 1924). Awerinzew (1910) no incluye a Haplosporidia en Neosporidia y lo relaciona a Mycetozoa y Amoebina. En concordancia con autores previos, Laveran & Pettit (1910) proponen un parentesco con los haplosporidios. Autores posteriores asocian Halposporidia con Rhizopoda, y también a *Rhinosporidium* con Phycomycota como Chytridinae (Ashworth 1924).

Un siglo después del descubrimiento de *Rhinosporidium seeberi*, dos trabajos confirman independientemente con caracteres moleculares su cercano parentesco con el DRIP (Herr *et al.* 1999; Fredericks *et al.* 2000), nombre utilizado por Ragan *et al.* (1996) para un clado formado por parásitos de peces de los géneros *Dermocystidium*, *Ichthyophonus* y el “Rosette agent” (*Sphaerothecum*). Con este grupo de patógenos se constituye la Clase Ichthyosporea (Cavalier-Smith 1998). Sin embargo, la polémica sobre la posición taxonómica de *R. seeberi* continuó ya que algunos trabajos asignaron a este patógeno secuencias de ADN que correspondían a hongos (Thankamani & Lipin Dev 2012) y cianobacterias (Ahluwalia *et al.* 1997; Ahluwalia 2001; ver también Mendoza *et al.* 2001a). A pesar de este prolongado debate en la comunidad científica, se considera actualmente a *R. seeberi* como un miembro de la Clase Ichthyosporea (ver Mendoza *et al.* 2001, Mendoza *et al.* 2002, Vilela & Mendoza 2012 y Glockling *et al.* 2013). La afinidad entre *Rhinosporidium* y parásitos del género *Dermocystidium* hallados en peces fue sugerida tempranamente por Dunkerly (1914) y también por Carini (1940), quien señala además un cercano parentesco entre éstos y la especie parásita de anfibios por él descripta *Dermosporidium hylarum*.

Desde su descripción, *Rhinosporidium seeberi* ha sido utilizado casi exclusivamente para nombrar patógenos de homeotermos. Algunos microorganismos asignados a *Rhinosporidium* identificados en el hombre y en aves y mamíferos domésticos en varios continentes, son consideradas hoy día sinónimos de *R. seeberi* (*Rhinosporidium amazonicum*, *Rhinosporidium*

ayyari, *Rhinosporidium canis*, *Rhinosporidium cygnus*, *Rhinosporidium equi*; Vilela & Mendoza 2012). Silva *et al.* (2005) encontraron que secuencias del gen 18S obtenidas de humanos de la India y Sri Lanka, y de aves y caninos de Norteamérica presentaron escasa variación, considerando entonces que la rinosporidiosis en estos hospedadores es causada por diferentes cepas de *R. seeberi*. Más recientemente Burgess *et al.* (2012) estudian un caso de rinosporidiosis en un equino exportado desde Argentina hacia Canadá y obtienen un fragmento de 358 pb del gen 18S (# acceso a GenBank JQ231220). El mismo presentó 100% de identidad con secuencias de *R. seeberi* publicadas previamente por Herr *et al.* (1999) y Fredericks *et al.* (2000), obtenidas a partir de infecciones en humanos de Sri Lanka y en un canino de EEUU respectivamente (incluyendo las secuencias AF118851 y AF158369 utilizadas en este estudio). Resultados similares son reportados por Leeming *et al.* (2007) quienes estudian casos de rinosporidiosis en equinos importados al Reino Unido también desde Argentina, indicando que la amplificación de un fragmento de 369 pb del gen 18S presentó una coincidencia exacta con las mismas secuencias de referencia mencionadas.

La evidencia disponible apoya la hipótesis de que *Rhinosporidium seeberi*, descrito originalmente en Argentina, es un patógeno cosmopolita adaptado a diferentes hospedadores aves y mamíferos. Una excepción es la consideración de Vilela y Mendoza (2012) de incluir en su sinonimia al parásito de anfibios *Dermosporidium hylarum*. Por último cabe mencionar que Scheid *et al.* (2015) describen durante el transcurso de este estudio a *Rhinosporidium rwandae*, parásito de anfibios africanos del género *Hyperolius*. En su análisis filogenético este nuevo patógeno resultó ser la especie hermana de *R. seeberi* (ver figura 6.3).

***Dermocystidium.*** Poco después del descubrimiento de *Rhinosporidium seeberi*, Pérez (1907) describe a *Dermocystis pusula* parásito de la piel del tritón *Triturus marmoratus* en Francia, causante de una enfermedad nodular quística (ver figura 6.2). El género *Dermocystis* ya había sido utilizado por Stafford (1905) para trematodos parásitos de peces, y por este motivo Pérez (1908) propone para su especie la combinación *Dermocystidium pusula*. Pérez (1907) reconoce la dificultad de establecer sus afinidades con otros protistas, y plantea una posible relación con hongos Entomophthorales. Posteriormente sugiere que por el aspecto del núcleo se trata de un hongo (Pérez 1913). Alexeieff (1911) por su parte lo relaciona con *Blastocystis* perteneciente a los Ascomycota, y De Beauchamp (1914) indica un posible parentesco con Chytridiomycota debido a la observación de zoosporas.

Guyénot & Naville (1922) poco tiempo después describen una nueva especie en la piel de anfibios anuros en Europa (*Rana temporaria*), *Dermocystidium ranae*. Numerosas especies parásitas de peces son descritas en este género, de las cuales solamente unas pocas han sido

incluidas en estudios moleculares, resultando el mismo polifilético (Feldman *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2005; Raffel *et al.* 2008; Vilela & Mendoza 2012).

***Dermomycooides***. Este género es propuesto por Granata (1919) para un parásito de la piel de *Lissotriton vulgaris* (como *Triturus vulgaris*) al que denomina *Dermomycooides beccarii*, y señala su semejanza con *Dermocystidium pusula*. Por su parte Poisson (1937) describe una segunda especie del género, *Dermomycooides armoriacus*, parásito de la piel en *Lissotriton helveticus* (como *Triturus palmatus*). Este autor menciona la formación de zoosporas en *D. armoriacus*, más complejas que las entonces conocidas para hongos del Orden Chytridiales, y los incluye en los Archimycota.

***Hepatosphera***. Gambier (1924) describe un parásito causante de enfermedad hepática en *Triturus cristatus* y lo llama *Hepatosphera molgarum*. Este autor encuentra también cicatrices cutáneas similares a las producidas por *Dermocystidium pusula*, y asume que ambos tipos de lesiones son causadas por el mismo parásito. Si bien encuentra que las relaciones de *Hepatosphera* son difíciles de precisar, encuentra una cercanía mayor con los hongos que con los protozoarios. El trabajo de Gambier (1924) es escasamente citado y discutido en la literatura (Poisson 1937; Brož 1944; Raffel *et al.* 2008). Esto se debe posiblemente a que no se han registrado otros casos similares de infección hepática y cutánea en anfibios aparentemente asociadas al mismo patógeno.

***Dermosporidium***. Este género es creado por Carini (1940) para *Dermosporidium hylarum*, señalando la gran similitud morfológica que presenta con *Rhinosporidium* y *Dermocystidium*. Dicho autor diferencia a *Dermosporidium* de *Rhinosporidium* por parasitar anfibios, presentar esporangios de mayor tamaño (400–500 vs 200–250  $\mu\text{m}$ ), y localizarse en la piel ya que *Rhinosporidium* afecta principalmente mucosas. Distingue además a *D. hylarum* de las especies de *Dermocystidium* entonces conocidas por tener sus endosporas múltiples cuerpos de inclusión, en vez de uno solo que desplaza el núcleo y citoplasma hacia la periferia de la célula. En base a este último criterio otras especies son asignadas a *Dermosporidium*. En primer lugar Weiser (1949) describe *Dermosporidium truttae* como parásito de la trucha *Salmo trutta fario* (como *Trutta fario*). Posteriormente, tres especies parásitas de anfibios son descritas, *Dermosporidium granulosum* y *Dermosporidium multigranulare* en anuros europeos del género *Rana* (Brož & Přívora 1952; Brož & Kulda 1954), y *Dermosporidium penneri* en sapos del género *Anaxyrus* (Bufonidae) de América del Norte (Jay & Pohley 1981).

La validez de las diversas especies de *Dermosporidium* parásitas de anfibios ha sido considerada en varios trabajos, siendo de Mello (1943) quien sugiere primero que *D. hylarum*

sería una adaptación de *Rhinosporidium seeberi* a un hospedador anfibio. En forma similar Herr *et al.* (1999) lo proponen junto a *D. granulorum* como sinónimos de *R. seeberi* debido a que parasitan vertebrados terrestres. Contrariamente, Pascolini *et al.* (2003) en una revisión morfológica incluyen a los parásitos de anfibios en el género *Amphibiocystidium*, reconociendo a las especies *D. hylarum* y *D. granulorum*, como *Amphibiocystidium hylarum* y *Amphibiocystidium granulorum* respectivamente. Comentan que el estatus taxonómico confuso de *D. hylarum* se debe a que Carini (1940) se refiere originalmente a éste como *Rhinosporidium* sp., pero en realidad este autor solamente hace mención a *Rhinosporidium* a los efectos de realizar comparaciones. Otros autores sugieren nuevamente en trabajos de revisión que *D. hylarum* es un sinónimo de *R. seeberi* (Arseculeratne & Mendoza 2005; Vilela & Mendoza 2012).

***Sphaerothecum.*** El género fue creado por Arkush *et al.* (2003) para el patógeno de peces *Sphaerothecum destruens* detectado en Norteamérica, e inicialmente conocido como “rosette agent” debido al aspecto de grupos de microorganismos en las preparaciones histológicas (Harrell *et al.* 1986). Éste fue recientemente detectado como un patógeno invasor perjudicial para especies nativas de Europa (Ercan *et al.* 2015).

***Amphibiocystidium.*** En el trabajo de Pascolini *et al.* (2003) se destaca que los esporangios de *Dermomycooides*, *Dermosporidium*, y *Dermocystidium* en hospedadores anfibios son indistinguibles histopatológicamente. Al no encontrar caracteres morfológicos diagnósticos diferenciales para estos géneros los consideran como *nomina dubia* en su aplicación a anfibios, pero no dudan de la validez de sus especies tipo *Dermomycooides beccarii*, *Dermosporidium hylarum* y *Dermocystidium pusula* respectivamente. A pesar de que los tres géneros antes mencionados fueron creados para parásitos de anfibios, los mencionados autores sugieren incluir a las especies de Dermocystida parásitas de estos hospedadores en el género *Amphibiocystidium*: *Amphibiocystidium armoriacus*, *Amphibiocystidium beccarii*, *Amphibiocystidium granulorum*, *Amphibiocystidium hylarum* (como “*Amphibiocystidium hylarum*”), *Amphibiocystidium penneri*, *Amphibiocystidium pusula* y *Amphibiocystidium ranae*. Sin embargo no reconocen a *Dermosporidium multigranulare*, que es sinonimizada con *A. ranae* debido a la similitud de los esporangios.

Pascolini *et al.* (2003) sugieren erróneamente que los caracteres utilizados por autores previos en la asignación de especies al género *Dermosporidium* son la forma de los esporangios y la presencia de septos alrededor de las esporas, considerando que los mismos no son suficientes para diferenciarlas de los *Dermocystidium* parásitos de anfibios. Con respecto a la creación del género *Dermomycooides* por Granata (1919), indican que dicho autor

propone la presencia de septos entre esporas, sitio de desarrollo de los esporangios y la reacción tisular del hospedador como característicos de estos parásitos. Por el contrario, Granata (1919) únicamente sugiere una afinidad morfológica entre *Dermomycoides* y *Dermocystidium*, sin indicar caracteres diferenciales relevantes.

La creación de *Amphibiocystidium* es justificada además por Pascolini *et al.* (2003) con el argumento de que las especies parásitas de anfibios se diferencian claramente de las de peces por presentar esporangios de variado tamaño y en diversos tejidos, con la eventual formación de zoosporas. Cabe resaltar que la morfología de los dermocistidios parásitos de ambos tipos de hospedadores es muy similar, al igual que la histopatología de las lesiones que producen (Hoshina & Sahara 1950; Elkan 1962; Červinka & Vítovek 1974; Feist *et al.* 2004; ver incluso Pascolini *et al.* 2003, p. 70).

Por otra parte Pascolini *et al.* (2003) sugieren reservar *Dermocystidium* para especies parásitas de peces con el criterio de evitar inestabilidad taxonómica debido a la cantidad de literatura disponible sobre el género en estos hospedadores. En este sentido designan a *Amphibiocystidium ranae* y *Dermocystidium salmonis* como especies tipo de *Amphibiocystidium* y *Dermocystidium* respectivamente. La asunción implícita de que los dermocistidios de anfibios constituyen un grupo natural es refutada por los resultados de varios análisis filogenéticos en los que *Amphibiocystidium* se recupera como parafilético (Vilela & Mendoza 2012) o polifilético (Raffel *et al.* 2008; Scheid *et al.* 2015; este estudio). Raffel *et al.* (2008) describen una nueva especie parásita de tritones norteamericanos *Notophthalmus viridescens*, y conservadoramente la incluyen en el género *Amphibiocystidium* como *Amphibiocystidium viridescens*.

Casos recientes de hallazgo de infección en urodelos de Europa occidental han sido considerados como causados por formas no identificadas de *Amphibiocystidium* (*Amphibiocystidium* sp.; Duffus & Cunningham 2010; Curtois *et al.* 2013; Stark & Guex 2014).

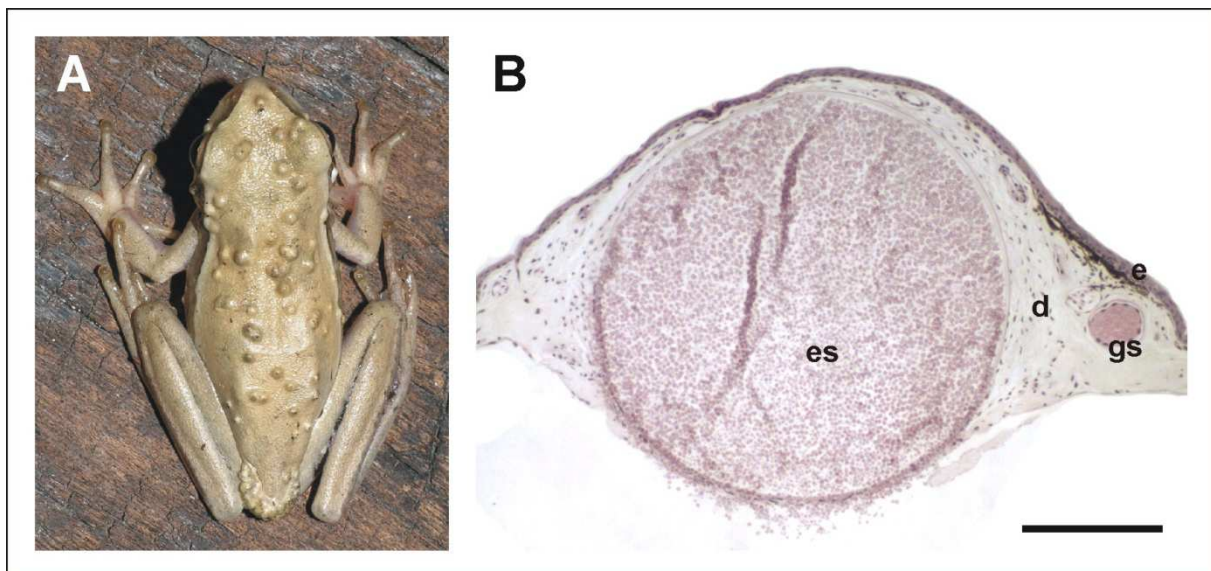
***Dermotheca*.** Pereira *et al.* (2005) sugieren este género para *Dermocystidium percae*, en base a caracteres morfológicos y los resultados de su análisis filogenético, en el que esta especie se recupera como basal en Dermocystida.

***Amphibiothecum*.** La reunión de especies de Dermocystida con múltiples granulaciones en el citoplasma en el género *Dermosporidium* (ver Jay & Pohley 1981) es cuestionada por el trabajo de Feldman *et al.* (2005). Estos autores crean el género *Amphibiothecum* para *Dermosporidium penneri* debido a su marcada divergencia genética con respecto a *Amphibiocystidium ranae*, designada especie tipo del género por Pascolini *et al.* (2003).

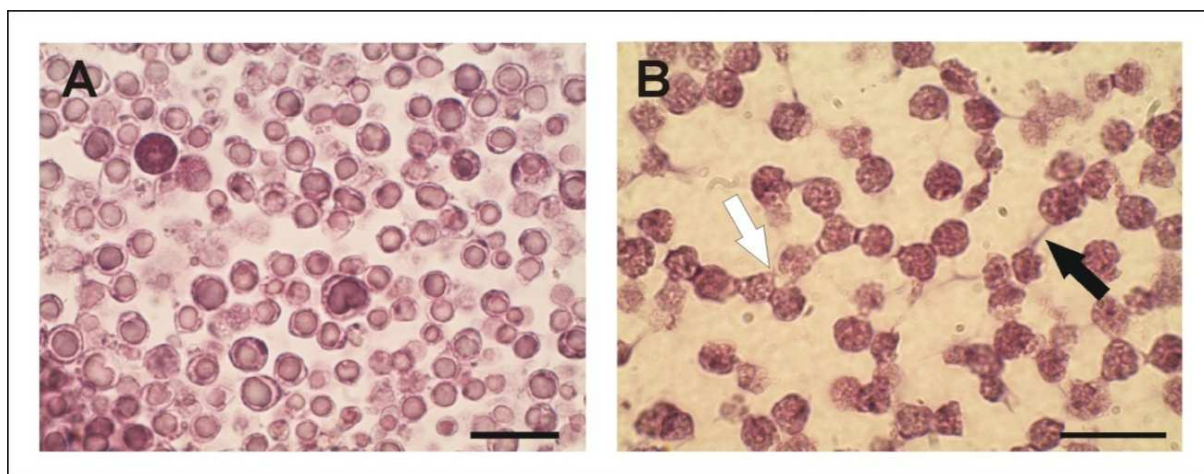
## Nuevos hallazgos de infección por Dermocystida

**Uruguay.** El primer ejemplar en el que se observaron lesiones macroscópicas típicas de infección por Dermocystida fue un macho adulto de *Hypsiboas pulchellus* colectado por el autor y F. Kolenc en Valentines, Dpto. de Treinta y Tres (33°15'11" S, 55°06'36" W), el 5 de setiembre de 2009, MNHN 9477. Presentaba numerosos nódulos en piel, principalmente en el dorso, algunos de ellos con pequeñas úlceras, evidentes con magnificación, figura 6.4 A la histopatología se identificaron en los nódulos esporangios capsulados de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , localizados en el tejido subcutáneo, y repletos de endosporas, figura 6.4 B. Las endosporas presentaron comúnmente una gran inclusión central, y menos frecuentemente múltiples granulaciones, figura 6.5.

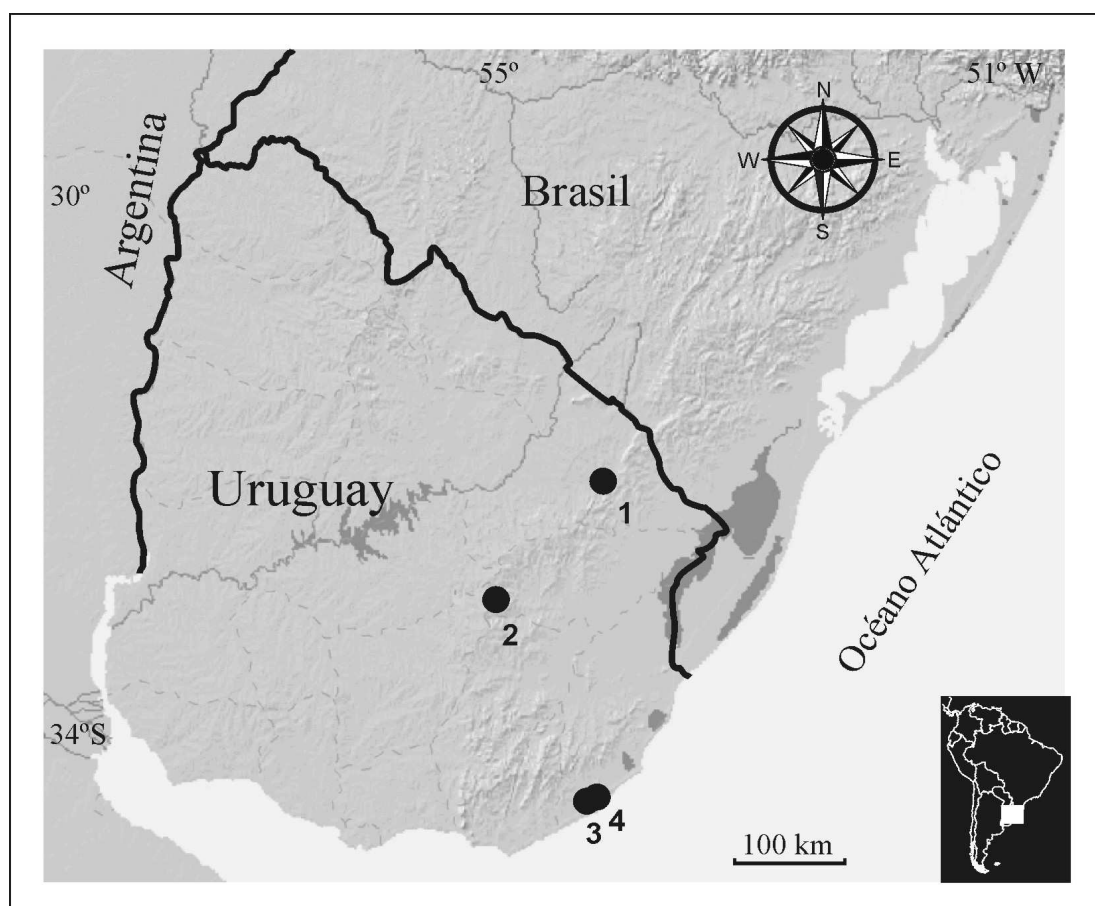
Ejemplares adultos de *H. pulchellus* de otras tres localidades presentaron lesiones similares: MNHN 9478, La Paloma (34°38'29" S, 54°12'39" W), Dpto. de Rocha, 11 de agosto de 2011; MNHN 9479, Río Tacuarí (32°32'45" S, 54°05'47" W), Dpto. de Cerro Largo, 23 de agosto de 2012; BKT 3466, Laguna de Rocha (34°39'45" S, 54°13'14" W), Dpto. de Rocha, 29 de setiembre de 2012. La infección no se detectó en otras especies de anuros de estos sitios (ver Apéndice 7). La localización geográfica de los ejemplares se indica en la figura 6.6.



**FIGURA 6.4.** Infección por Dermocystida en *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9477, Valentines, Dpto. de Treinta y Tres, Uruguay (5/IX/2009). **A**, lesiones nodulares en cabeza y dorso. **B**, corte histológico de un nódulo. Se observa un esporangio repleto de endosporas, tinción H&E. Barra = 200  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas: d, dermis; e, epidermis, es, esporangio; gs, glándula serosa.



**FIGURA 6.5.** Infección por Dermocystida en *Hypsiboas pulchellus*, La Paloma, Dpto. de Rocha, Uruguay. **A**, endosporas, la mayoría con una gran inclusión central; preparación histológica de ejemplar MNHN 9477, tinción H&E. Barra = 20  $\mu$ m. **B**, endosporas con múltiples granulaciones, dispuestas en cadenas (flecha blanca), y unidas por “puentes” de aspecto mucilaginoso (flecha negra); preparación histológica de ejemplar MNHN 9506, tinción H&E. Barra = 20  $\mu$ m.



**FIGURA 6.6.** Distribución geográfica de los hallazgos de infección por Dermocystida en *Hypsiboas pulchellus* en Uruguay. Localidades: 1, Río Tacuarí; 2, Valentines; 3, La Paloma; 4, Laguna de Rocha.

**Brasil.** Se capturaron 41 ejemplares pertenecientes a 2 especies de *Scinax* del grupo *ruber*, *Scinax fuscovarius* (n = 39) y *Scinax similis* (n = 2). En una muestra de 18 ejemplares de la primera colectados en un área abierta agrícola-ganadera en los alrededores de Rio Claro (22°33' S, 47°71' W), 2 presentaron lesiones cutáneas asimilables a infección por Dermocystida, CFBH 39120 y 39121. Ambos presentaron un buen estado general y de las masas musculares, y no exhibieron posturas o comportamientos anormales. A la disección bajo lupa binocular, sin extracción de las vísceras, no se detectaron lesiones internas.

El ejemplar CFBH 39120 (macho, LHC 39,4 mm), presentó un único nódulo de unos 0,5 mm de diámetro en proceso de ulceración, en la piel del flanco izquierdo próximo a la zona inguinal, moderadamente elevado sobre la superficie corporal y que a la disección evidenció un contenido blanquecino, figura 6.7. Este caso fue asignado a *Dermosporidium hylarum* debido a la localización geográfica, hospedador y patología macroscópica.

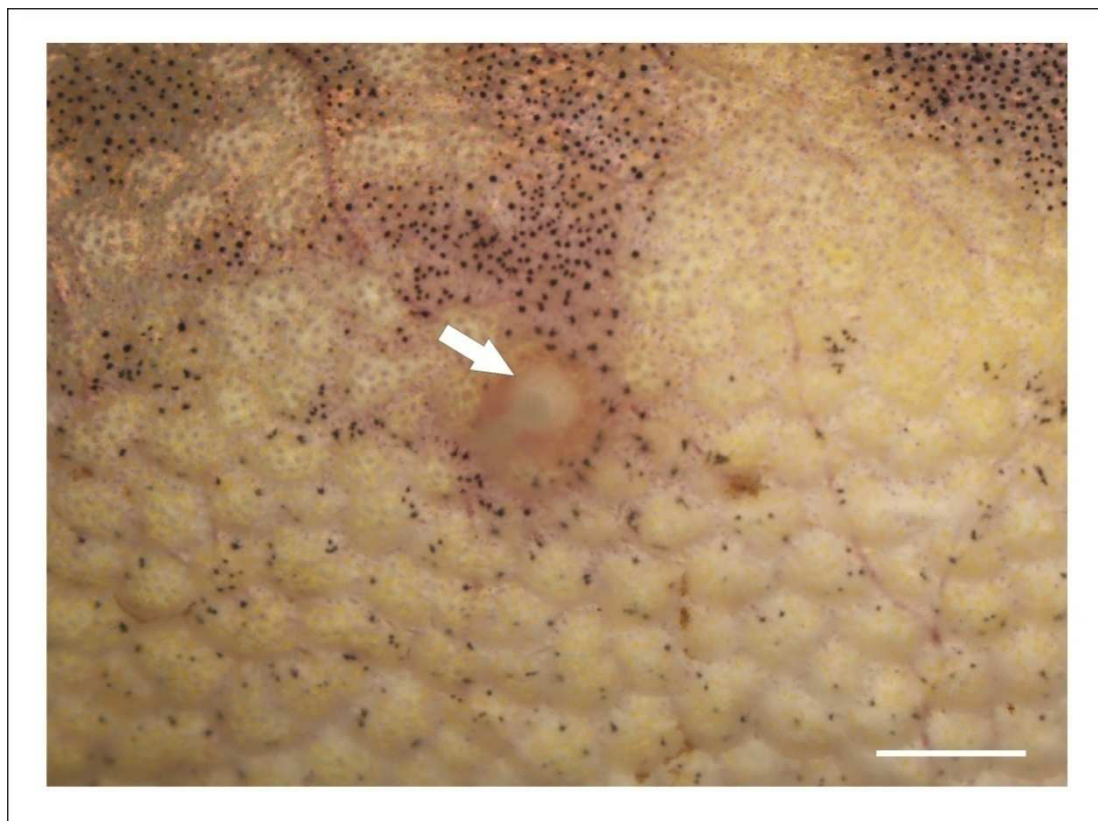
(1) Localización geográfica. El sitio de colecta, Sitio Cantaclaro, está aproximadamente 100 km al norte de Tietê, localidad tipo de *Dermosporidium hylarum*.

(2) Hospedador. El hospedador originalmente reportado por Carini (1940) es el anfibio hílido “*Hyla rubra*”, actualmente un complejo de especies del grupo *ruber* del género *Scinax* (ver Frost 2016). Una de estas especies, *S. fuscovarius*, es muy común en Tietê y alrededores, y muy probablemente es la especie correspondiente a los cientos de ejemplares de esta localidad estudiados por Carini. El espécimen CFBH 39120 fue colectado en una época coincidente con los hallazgos de Carini (1940) en octubre y noviembre, al comienzo de la estación lluviosa.

(3) Patología. Las lesiones macroscópicas indicadas por Carini (1940) en la descripción de *Dermosporidium hylarum* son: nódulos en piel levemente protruidos (“A pele não apresentava alterações, só aparecia ligeiramente levantada...”) de aproximadamente 1 mm, conteniendo quistes circulares u ovlados (“...quistos arredondados u ovalares, situados na derma, logo debaixo da camada epitelial...”), con un contenido blanquecino y blando (“...uma substancia branca, móle...”).

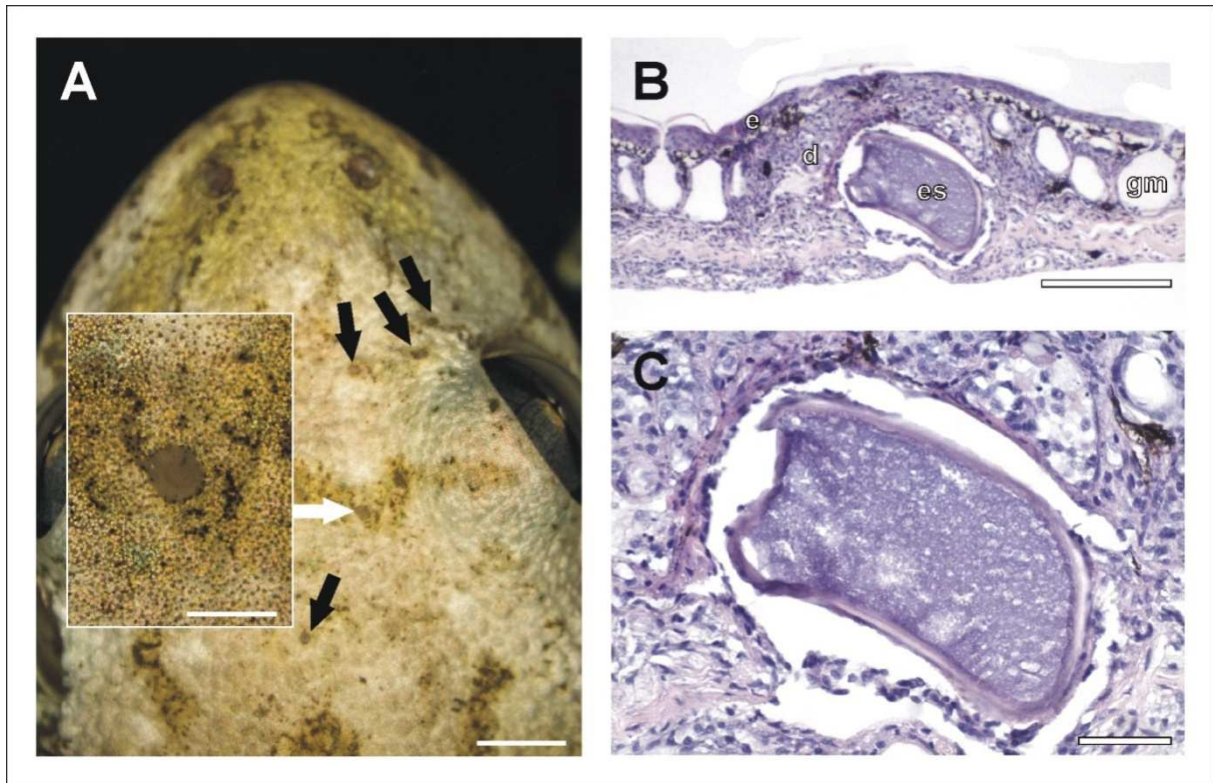
El contenido del nódulo el ejemplar CFBH 39120 se utilizó para extraer ADN, e incluir la secuencia correspondiente en el análisis filogenético.





**FIGURA 6.7.** Infección por Dermocystida en *Scinax fuscovarius* CFBH 39120, Rio Claro, São Paulo, Brasil (3/XI/2014). La flecha indica un nódulo en piel del flanco izquierdo (flecha), conteniendo un esporangio de color blanquecino. Barra = 1 mm.

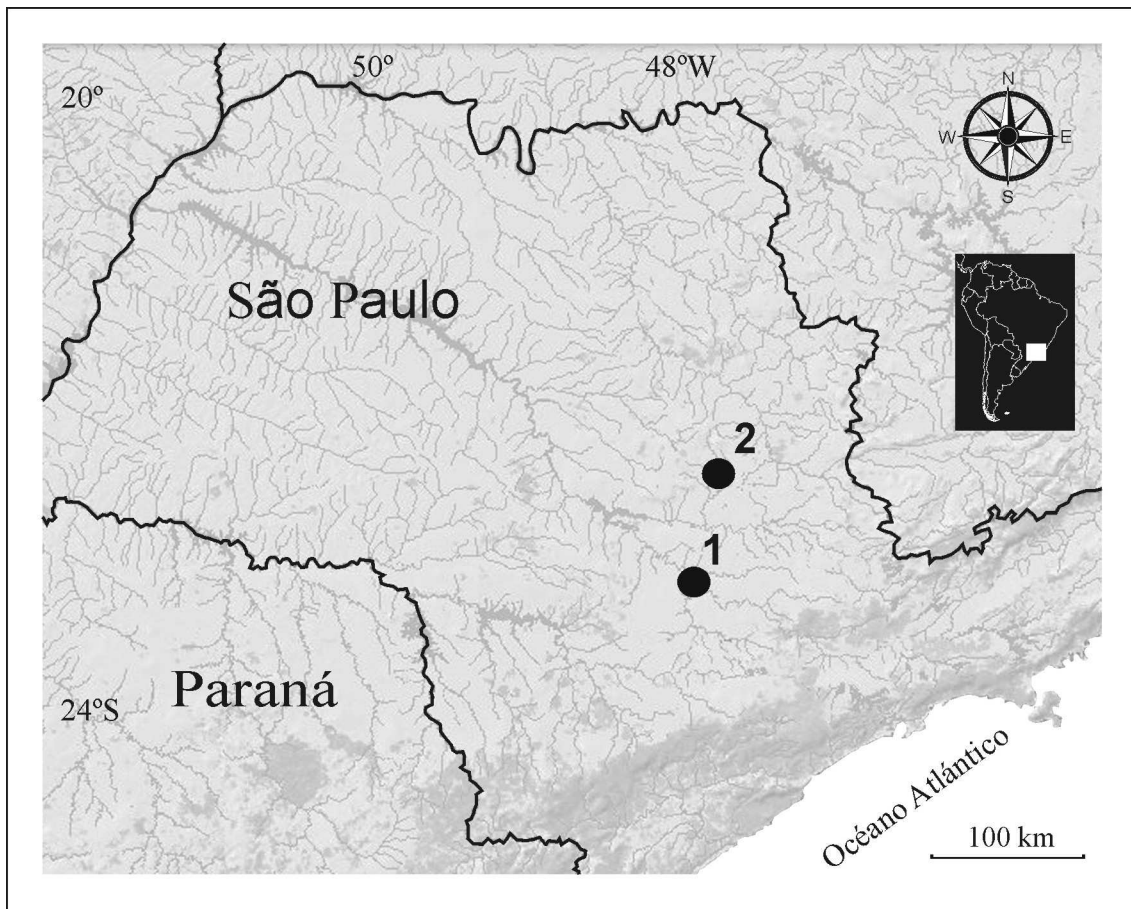
El ejemplar CFBH 39121 (macho, LHC 43,5 mm), presentó seis pequeñas lesiones nodulares en la piel dorsal de la cabeza y ocho en la región dorsal del tronco de aspecto ulceroso y color grisáceo, apenas elevadas sobre la superficie corporal, figura 6.8 A. Un nódulo situado en la región anterior y medial al ojo derecho fue procesado para histopatología, figura 6.8 B, C. El mismo presentó una cavidad de aproximadamente 150 x 200  $\mu\text{m}$  delimitada por una delgada capa de células aplanadas, conteniendo un esporangio con una fina cápsula eosinofílica de unas 10  $\mu\text{m}$  de espesor, figura 6.8 B. Éste pareció estar en un estadio inmaduro ya que no se visualizaron esporas con una silueta definida, siendo su contenido homogéneo y basófilo, ver figura 6.8 C. El contenido de una de las lesiones fue utilizado para extraer ADN, las secuencias correspondientes se incluyeron en el análisis filogenético como BR2. La localización geográfica de los nuevos casos de infección por Dermocystida en ejemplares de *Scinax* se muestra en la figura 6.9.



**FIGURA 6.8.** Infección por Dermocystida en *Scinax fuscovarius* CFBH 39121, Rio Claro, São Paulo, Brasil (3/XI/2014). **A**, lesiones ulceradas en el dorso de la cabeza (flechas). Barra = 2 mm. El recuadro muestra la lesión indicada por la flecha blanca (barra = 1 mm). **B**, corte histológico de una lesión, tinción H&E, vista panorámica. Barra = 200  $\mu$ m. **C**, misma imagen a mayor aumento. Barra = 50  $\mu$ m. Abreviaturas: d, dermis; e, epidermis; es, esporangio; gm, glándula mucosa.

## Análisis genéticos y filogenéticos

Se obtuvieron secuencias a partir de dos de las siete muestras de ejemplares de *Hypsiboas pulchellus* de Uruguay, KU982983 (MNHN 9507, La Paloma) y KU982984 (MNHN 9477, Valentines), y de los dos ejemplares de *Scinax fuscovarius* de Rio Claro, Brasil, KU982982 (CFBH 39120) y KU982985 (CFBH 39121). Las primeras presentaron una longitud de 780 y 1469 pb respectivamente y fueron 100 % homólogas, indicando que se trata del mismo patógeno. Las secuencias de Brasil presentaron longitudes de 1380 y 1351 pb respectivamente, y se incluyeron en el análisis como *Dermosporidium hylarum* y una especie no identificada de Dermocystida.



**FIGURA 6.9.** Localización geográfica de Dermocystida parásitos de anfibios en el sureste de Brasil, estado de São Paulo. Localidades: 1, Tietê (localidad tipo de *Dermosporidium hylarum*, Carini 1940); 2, Sitio Cantaclaro, Rio Claro (este estudio).

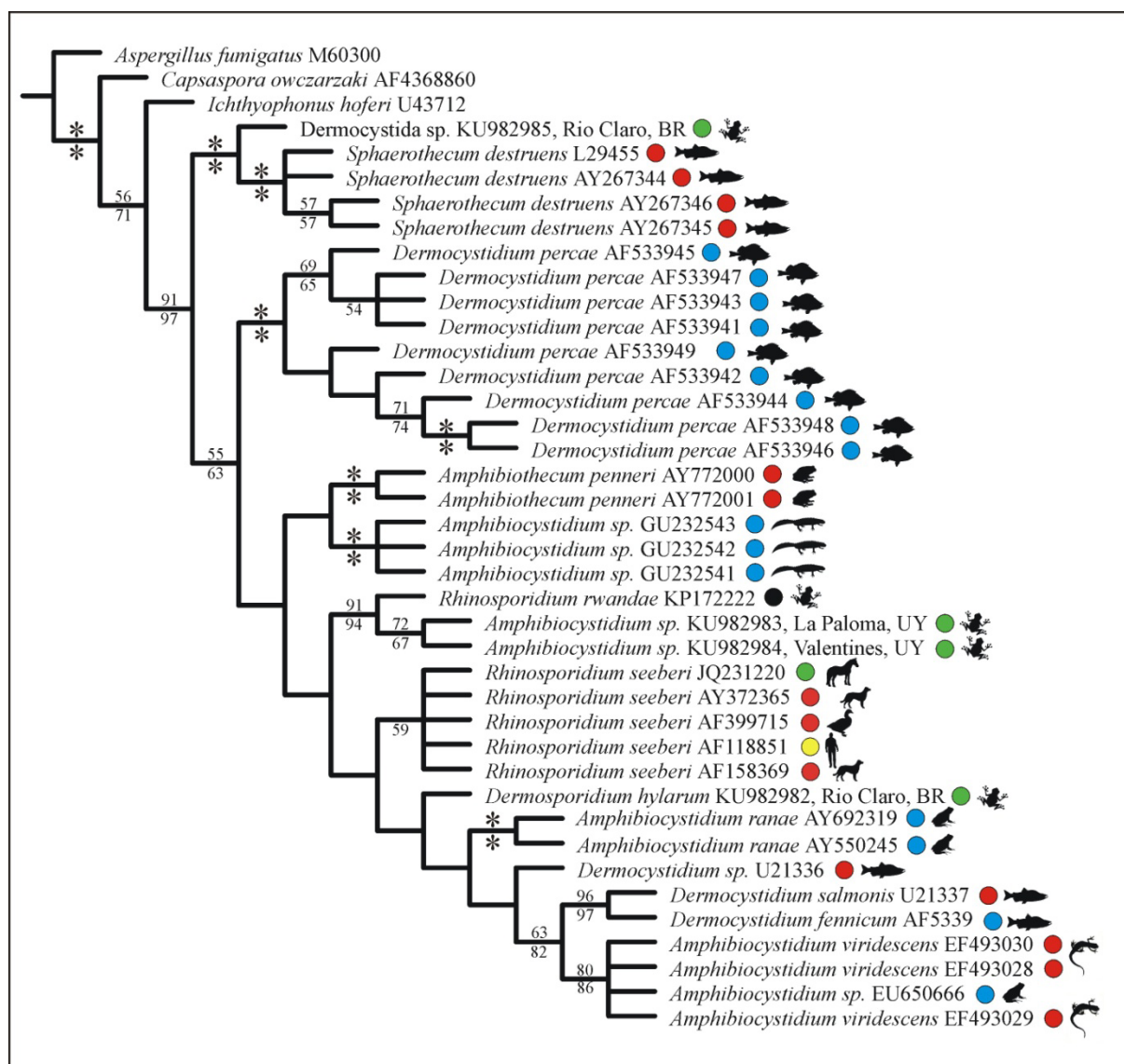
Las relaciones filogenéticas en la muestra se establecieron en base a una región homóloga de 1850 bases. Las secuencias analizadas sin tener en cuenta los “gaps” tuvieron un mínimo de 358 y un máximo de 1820 bases. El análisis produjo cinco árboles de 976 pasos, muy similares entre sí (Apéndice 5). La topología de consenso estricto se muestra en la figura 6.10. Dermocystida está conformado por tres clados principales con buen soporte. Uno de ellos incluye a la secuencia correspondiente a la especie de Dermocystida no identificada de Brasil obtenida en este estudio, como terminal hermano del patógeno de peces *Sphaerothecum destruens*, con el que guarda una divergencia de 2,5–2,8 %. Otro de los clados está constituido por todas las secuencias disponibles del parásito de peces *Dermocystidium percae*. Un tercer clado presenta varios grupos bien diferenciados. Por un lado *Amphibiothecum penneri* aparece como grupo hermano de *Amphibiocystidium* sp. (González-Hernández *et al.* 2010), aunque

ambos taxones están bien diferenciados entre sí, con marcadas divergencias genéticas (> 7 %), y a su vez con el resto de Dermocystida (> 3 %). Los restantes taxones aparecen en el análisis formando un clado con bajo soporte, con relaciones internas entre taxones no bien definidas y que incluye a *Rhinosporidium seeberi*. La divergencia genética interna en este clado es baja, en la mayoría de las comparaciones entre especies se sitúa entre 1 y 2 % (0,8–4,1). *Amphibiocystidium* sp. de Uruguay resultó ser el terminal hermano de *R. rwandae*, mientras que *Amphibiocystidium* sp. parásito de *Rana italica* se agrupa con *A. viridescens* de Norteamérica. Las distancias genéticas se muestran en el Apéndice 6.

## Discusión

Previo a este estudio la enfermedad por patógenos del Orden Dermocystida en Sudamérica era conocida principalmente por reportes de rinosporidiosis en mamíferos. La rinosporidiosis humana está ampliamente extendida en el continente, conociéndose casos principalmente de Argentina (Seeber 1900; Niño & Freire 1964), Brasil (de Mello 1943; Netto & Furtado 1973; da Silva *et al.* 1975), Chile (Brevis *et al.* 2010), Colombia (Vélez *et al.* 2011), Paraguay (Rolon 1974) y Venezuela (Stachowsky 1959). Si bien esta enfermedad tiene en general baja incidencia tanto en humanos como en animales domésticos, es endémica en algunas zonas de Brasil, Paraguay el norte de Argentina, donde afecta humanos y también equinos, caninos y bovinos (Niño & Freire 1964; Netto & Furtado 1973; Rolon 1974; Luciani & Toledo 1989; Romero *et al.* 2008). En el resto del continente es de hallazgo ocasional, aunque en condiciones favorables para el patógeno como el contacto permanente con ambientes acuáticos se ha observado alta incidencia en bovinos (Luciani & Toledo 1989). En Uruguay se difundió recientemente en internet un caso de infección de la mucosa nasal en un equino diagnosticado en 2008 en Barras del Tacuarí, Dpto. de Treinta y Tres (Arismendi 2008), y existe al menos un caso en humanos cuyos de talles no han sido publicados (Parodi 1930).

En anfibios neotropicales se conocía solamente por un viejo reporte del sureste de Brasil anteriormente discutido (Carini 1940). La falta de diagnósticos posteriores puede explicarse por la escasa producción científica existente en la región sobre enfermedades infecciosas de anfibios, exceptuando la quitridiomycosis. Los nuevos casos aquí observados en anuros de los géneros *Scinax* e *Hypsiboas* amplían significativamente la distribución conocida de estos patógenos en la región centro-este de Sudamérica, donde su diversidad y rango de especies hospedadoras es seguramente mucho mayor.



**FIGURA 6.10.** Árbol más parsimonioso de los Dermocystida (consenso estricto). Los soportes de los nodos corresponden a Bootstrap (superior) y Jackknife (inferior); los asteriscos indican valores de 100%. Se indican números de acceso a GenBank, origen de las secuencias (● América del Norte; ● América del Sur; ● Europa; ● África; ● Asia), y se representa el tipo de hospedador (🐟 perca; 🐟 salmónidos; 🐸 anfibios trepadores; 🐸 anfibios ránidos; 🐸 anfibio bufónido; 🐸 anfibios urodelos; 🦆 ganso; 🐕 perro; 🐎 caballo; 🧑 hombre). Abreviaturas: BR, Brasil; UY, Uruguay.

Esto es válido también para amplias regiones de otros continentes como África y Norteamérica, donde existen pocos casos registrados en anfibios (Raffel *et al.* 2008; Scheid *et al.* 2015). Cabe destacar que en un reporte reciente de micosis cutánea en anfibios de Western Ghats, India, se presentan lesiones diagnósticas de infección por dermocistidios, nódulos

cutáneos ulcerados y esporangios capsulados repletos de endosporas, siendo posiblemente el primer caso conocido de Asia (Gururaja *et al.* 2011). En la región Neotropical más estudios son necesarios para conocer la distribución y diversidad de estos parásitos en anfibios.

Los caracteres tradicionalmente utilizados para diferenciar géneros y especies de Dermocystida patógenas de anfibios han sido controvertidos, ya que la morfología de estos parásitos es bastante conservada. Algunos de ellos como la forma de los esporangios y el aspecto de las esporas puede ser variable incluso en una misma especie (Raffel *et al.* 2008; este estudio). La incorporación de caracteres moleculares ha permitido esclarecer las relaciones de parentesco entre los distintos taxones incluidos en Ichthyosporrea. En el análisis realizado los géneros *Amphibiocystidium* y *Dermocystidium* aparecen como polifiléticos. En estudios previos *Dermocystidium* se comportó como un taxón polifilético (Feldman *et al.* 2005; Pereira *et al.* 2005; Raffel *et al.* 2008; Vilela & Mendoza 2012; Scheid *et al.* 2015) y *Amphibiocystidium* como parafiletico (Vilela & Mendoza 2012) o polifilético (Raffel *et al.* 2008; Scheid *et al.* 2015). Los patógenos de anfibios agrupados actualmente en *Amphibiocystidium* no constituyen un grupo natural y la mayoría de ellos están cercanamente emparentados con patógenos de peces.

*Rhinosporidium seeberi* aparece formando parte de un clado con divergencias genéticas internas relativamente bajas, que reúne a especies de *Dermocystidium* y las especies tipo *Amphibiocystidium ranae* y *Dermosporidium hylarum*. En el mismo el nombre *Rhinosporidium* tiene prioridad, lo cual implica sinonimizar con éste a los géneros *Amphibiocystidium* y *Dermosporidium*. Considero utilizar entonces la nueva combinación *Rhinosporidium hylarum* para la especie descrita por Carini (1940). Las secuencias de *Rhinosporidium seeberi* presentan muy baja variabilidad, lo cual está de acuerdo con la visión de esta especie como un patógeno de distribución cosmopolita, con cepas adaptadas a diferentes hospedadores (Silva *et al.* 2005; Vilela & Mendoza 2012). La inclusión en este estudio de la secuencia JQ231220 obtenida a partir de material topotípico (equino con rinosporidiosis de Argentina, Burgess *et al.* 2012) refuerza esta idea.

Los casos de infección en *Hypsiboas pulchellus* del sur y este de Uruguay son los más australes conocidos para Dermocystida parásitos de anfibios. Las secuencias correspondientes presentaron muy poca variación con respecto a la publicada para *Rhinosporidium rwandae* KP172222 (0,2 %), por lo que en base a la evidencia disponible se le asigna aquí a dicho taxón. Es particularmente interesante además la semejanza existente entre ambas formas con respecto a las lesiones macroscópicas e histopatología (ver Scheid *et al.* 2015 y Capítulo 7 de esta tesis). Este patógeno de anfibios puede que se encuentre ampliamente distribuido y aún

subdiagnosticado. Su distribución disyunta podría explicarse por dispersión natural transoceánica entre América y África, como ya se ha comprobado para saurios gekónidos y aves (Arendt 1988; Gamble *et al.* 2011).

En el caso de *Amphibiocystidium* sp. parásito de *Rana italica* de Italia, las secuencias resultaron idénticas a las de *Rhinosporidium viridescens* de Estados Unidos parásito del tritón *Notophthalmus viridescens*. Puede tratarse también de un caso de dispersión natural transoceánica o influida por actividades humanas ya que *N. viridescens* es comercializado en el mercado internacional de anfibios vivos, lo cual puede haber generado la introducción de patógenos asociados a esta especie en Europa. La dispersión de numerosos patógenos mediante organismos acuáticos utilizados en acuicultura ha sido ampliamente documentada en Europa, incluyendo la introducción de *Sphaerothecum destruens*, diseminado por el ciprínido invasor *Pseudorasbora parva* (Gozlan *et al.* 2005; Gozlan *et al.* 2009; Peeler *et al.* 2011; Ercan *et al.* 2015). La dispersión a distancia también ha ocurrido con *Rhinosporidium seeberi* por el transporte de equinos vivos desde Sudamérica hacia Canadá y Europa (Lengfelder & Pospischil 1980; Leeming *et al.* 2007; Burgess *et al.* 2012).

La consideración de la presencia de múltiples granulaciones en el citoplasma de las esporas, utilizada previamente para la asignación de especies al género *Dermosporidium* (ver Jay & Pohley 1981), carece de validez. Este carácter está presente en *Rhinosporidium hylarum* (Carini 1940), en *Amphibiothecum penneri* (Jay & Pohley 1981), en el parásito de peces *Dermosporidium truttae* (Weiser 1949), y es variable en los casos aquí estudiados de *Rhinosporidium rwandae* en Uruguay.

La secuencia de Dermocystida sp. obtenida de microorganismos infectando el ejemplar de *Scinax fuscovarius* CFBH 39121 corresponde a una segunda especie del género *Sphaerothecum*. Es éste el primer registro del género fuera del hemisferio norte (Arkush *et al.* 2003; Andreou *et al.* 2012), y también el primer caso de infección en anfibios. Es asimismo novedoso el hallazgo de infección por otro Dermocystida en la misma población de anfibios (*Rhinosporidium hylarum*). La enfermedad causada en peces por *Sphaerothecum* fue identificada en 1984 como una afección sistémica de salmónidos en EEUU, y el parásito causante denominado en un principio “rosette agent” dado el aspecto microscópico de grupos de microorganismos (Harrell *et al.* 1986). Este patógeno es intracelular, puede afectar múltiples órganos y no forma esporangios (Harrell *et al.* 1986; Arkush *et al.* 2003). El esporangio observado en el ejemplar CFBH 39121 probablemente corresponda a una etapa inmadura, ya que el aspecto de su contenido a la histopatología es muy similar al estadio

sincitial de esporangios de *Ichthyophonus* parásitos de anfibios (Goodchild 1953; ver figura 8.5 del Capítulo 8).

Las secuencias obtenidas por González-Hernández *et al.* (2010) asignadas por los autores a *Amphibiocystidium* sp. y obtenidas a partir de ejemplares de *Lissotriton helveticus* de Larzac en el sur de Francia, son aquí consideradas como correspondientes a *Dermocystidium pusula* descrito por Pérez (1907; 1908) en casos de infección de tritones de los alrededores de Bourdeaux, en el suroeste de dicho país (ca. 300 km W).

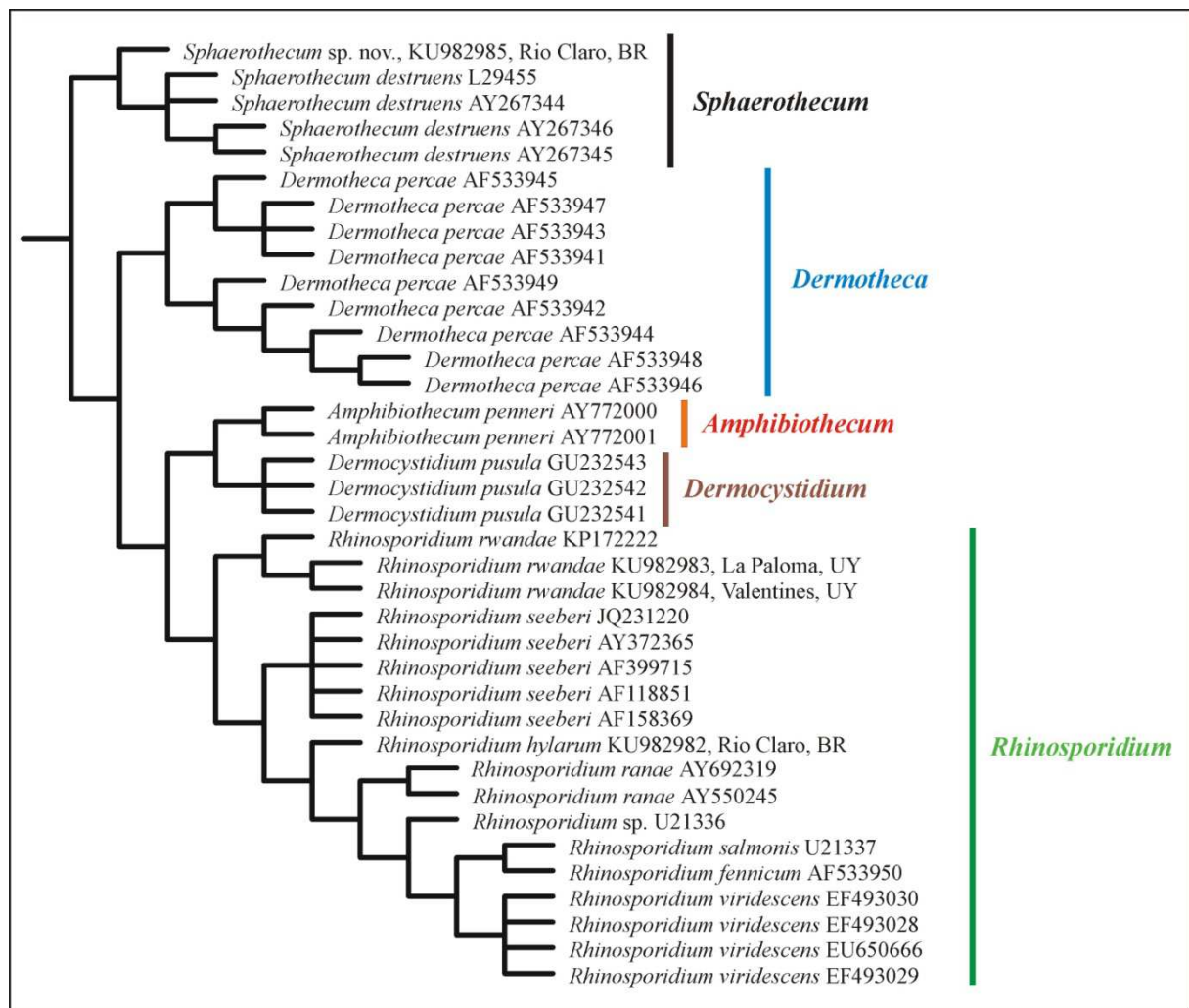
Por su parte, la divergencia genética observada en *Dermocystidium percae*, justifica su consideración en el género *Dermotheca* como sugieren Pereira *et al.* (2005). Los cambios taxonómicos propuestos en base a los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.11. Más estudios moleculares son necesarios para caracterizar mejor las relaciones de parentesco en Dermocystida, tanto para evaluar taxones cercanamente emparentados como para estudiar la validez de especies conocidas únicamente por su descripción morfológica (ej. *Dermocystidium granulatum*, *Hepatosphaera molgarum*). Esto permitiría esclarecer la validez de *Dermomycooides*, estableciendo si su especie tipo *D. beccarii* es o no un sinónimo de *Dermocystidium pusula*. Resta investigar también la identidad de microorganismos involucrados en reportes recientes de infección en anfibios Norteamérica que provisoriamente podrían referirse al *Rhinosporidium* (Green *et al.* 2002) y en Europa, que podrían atribuirse a *Dermocystidium pusula* en el caso de hospedadores urodelos y *Rhinosporidium ranae* en hospedadores anuros (Duffus & Cunningham 2010; Curtois *et al.* 2013; Stark & Guex 2014) hasta que se evalúe la especificidad de hospedador de estos patógenos. La información disponible sobre las especies parásitas de anfibios se resume en la tabla 6.2

### **Redescripción de *Rhinosporidium hylarum* (Carini 1940).**

**Localidad tipo:** Tietê (23°11' S, 47°71' W), estado de São Paulo, Brasil. **Hospedador tipo:** *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925), Hylidae, Amphibia, macho adulto, colectado en Sitio Cantaclaro, Distrito de Itapé, Município de Rio Claro, São Paulo (22°19' S, 47°42' W; 630 m s.n.m.), el 3 de noviembre de 2014, y depositado en la colección Célio F. B. Haddad, del Departamento de Zoología de la Universidad Estadual Paulista - UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil, CFBH 39120. **Sitio de infección:** piel dorsal y ventral, lesiones nodulares ulcerosas, con contenido de color blanquecino, figura 6.7. **Descripción:** parásitos de la dermis de *S. fuscovarius*. Esporangios esféricos de 0,5 mm, limitados por una cápsula de 3–4 µm de espesor, conteniendo numerosas esporas de 8–10 µm de diámetro



(Carini 1940). **Hapantotipo:** secuencia parcial del gen 18S ARNr depositada en GenBank (KU982982), obtenida de *S. fuscovarius* CFBH 39120. **Observaciones:** ejemplares de otras especies de anfibios colectados en el sitio de estudio (ver Apéndice 2), no presentaron lesiones similares.



**FIGURA 6.11.** Relaciones filogenéticas obtenidas en Dermocystida y nuevo ordenamiento taxonómico propuesto.

**TABLA 6.2.** Infección por Dermocystida en anfibios, presentación y diversidad de especies pertenecientes a los géneros *Amphibiothecum*, *Dermocystidium*, *Dermomycooides* (De), *Hepatosphera*, *Rhinosporidium* y *Sphaerothecum*.

Especie	Hospedador	País	Sitio de infección	Forma y tamaño del esporangio (mm)	Septos en esporangio	Esporas (µm)	Gránulos en esporas	Zoosporas	Fuente
<i>A. penneri</i>	<i>Anaxyrus americanus</i> , <i>A. canorus</i>	EEUU	Piel; enf. diseminada	Esférico	Sí	10–12	Múltiples	No	Jay & Pohley (1981), Green & Sherman (2001), Green <i>et al.</i> (2002)
<i>D. granulatum</i>	<i>Rana temporaria</i>	Rep. Checa	Piel	Oval/esférico (1)	Sí	10	Múltiples	No	Brož & Přivora (1952)
<i>D. pusula</i>	<i>Alytes obstetricans</i> , <i>Lissotriton helveticus</i> , <i>Triturus cristatus</i> , <i>T. marmoratus</i>	Escocia, Francia	Piel	Esférico	Sí/No	8–10	Único/Múltiples	No	de Beauchamp (1914), Moral (1913), Pérez (1907; 1913), Duffus & Cunningham (2010), González-Hernández <i>et al.</i> (2010), Curtois <i>et al.</i> (2013)
<i>De. armoriacus</i>	<i>Lissotriton helveticus</i>	Francia	Piel	Esférico (0,5–2)	No	2–20	Uno o dos	Sí	Poisson (1937)
<i>De. beccarii</i>	<i>Lissotriton vulgaris</i>	Italia	Piel	Oval/esférico	No	4–10	Múltiples	No	Granata (1919)
<i>H. molgarum</i>	<i>Ichthyosaura alpestris</i> , <i>Lissotriton helveticus</i> , <i>Triturus cristatus</i>	Francia	Piel, hígado	-----	-----	6–10	-----	No	Gambier (1924)
<i>R. hylarum</i>	<i>Scinax fuscovarius</i>	Brasil	Piel	Esférico (0,4–0,5)	No	8–10	Múltiples	No	Carini (1940), este estudio
<i>R. ranae</i>	<i>Alytes obstetricans</i> , <i>Pelophylax esculentus</i> , <i>Rana temporaria</i>	Francia, Holanda, Italia, Suiza	Piel	“U”	No	7–9	Único o múltiples	No	Guyénot & Naville (1922), Remy (1931), Brož (1944), Brož & Kulda (1954), Pascolini <i>et al.</i> (2003), Stark & Guex (2014)
<i>R. rwandae</i>	<i>Hyperolius lateralis</i> , <i>H. viridiflavus</i> , <i>Hypsiboas pulchellus</i>	Ruanda, Uruguay	Piel, corazón	Esférico (0,3–0,8)	No	4–12	Único/Múltiples	No	Scheid <i>et al.</i> (2015), este estudio
<i>R. viridescens</i>	<i>Notophthalmus viridescens</i>	EEUU, Italia	Piel, hígado	Oval/esférico/“C”/	No	5–9	Único	No	Raffel <i>et al.</i> (2008), Federici <i>et al.</i> (2015)
<i>R. sp.</i>	<i>Gyrinophilus porphyriticus</i>	EEUU	Piel (?)	-----	-----	-----	-----	-----	Green <i>et al.</i> (2002)
<i>S. sp. nov.</i>	<i>Scinax fuscovarius</i>	Brasil	Piel	Ovoide (0,15–0,2)	-----	-----	-----	No	Este estudio

## Descripción de *Sphaerothecum* sp. nov.

**Localidad tipo:** Sitio Cantaclaro, Distrito de Itapé, Município de Rio Claro, (22°19' S, 47°42' W; 630 m s.n.m.), estado de São Paulo, Brasil. **Hospedador tipo:** *Scinax fuscovarius* (Lutz, 1925), Hylidae, Amphibia, macho adulto, colectado el 3 de noviembre de 2014, y depositado en la colección Célio F. B. Haddad, del Departamento de Zoología de la Universidad Estadual Paulista - UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil, CFBH 39121. **Sitio de infección:** piel dorsal, lesiones nodulares ulcerosas, con contenido de color grisáceo, figura 6.8. **Descripción:** parásitos de la dermis de *S. fuscovarius*. Esporangios (inmaduros) de 150–200 µm, cápsula de aproximadamente 10 µm y de contenido basófilo homogéneo. **Hapantotipo:** secuencia parcial del gen 18S ARNr depositada en GenBank (KU982985), obtenida de *S. fuscovarius* CFBH 39121.

## Referencias

- Ahluwalia, K.B. (2001) Causative agent of Rhinosporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 413.
- Ahluwalia, K.B., Maheshwari, N. & Deka, R.C. (1997) Rhinosporidiosis: a study that resolves etiologic controversies. *American Journal of Rhinology*, 11(6), 479–483.
- Alexeieff, A. (1911) Sur la nature des formations dites “kystes de *Trichomonas intestinalis*”. *Comptes Rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 44, 296–298.
- Andreou, D., Arkush, K.D., Guégan, J.F. & Gozlan, R.E. (2012) Introduced pathogens and native freshwater biodiversity: a case study of *Sphaerothecum destruens*. *PLoS ONE*, 7(5), e36998.
- Arendt, W.J. (1988) Range expansion of the Cattle Egret (*Bubulcus ibis*) in the Greater Caribbean Basin. *Colonial Waterbirds*, 11, 252–262.
- Arismendi, R. (2008) Rhinosporidiosis equina. Disponible en: <http://www.vet-uy.com/articulos/equinos/050/0046/eq046.htm> (accedido el 16 de febrero de 2015)
- Arkush, K.D., Mendoza, L., Adkison, M.A. & Hedrick, R.P. (2003) Observations on the life stages of *Sphaerothecurn destruens* n. g., n. sp., a mesomycetozoean fish pathogen formally referred to as the Rosette Agent. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(6), 430–438.
- Arseculeratne, S.N. & Mendoza, L. (2005) Chapter 26. *Rhinosporidium seeberi*. En: *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10<sup>ma</sup> ed., John Wiley & Sons.
- Ashworth, J.H. (1924) XVI.—On *Rhinosporidium seeberi* (Wernicke, 1903), with special reference to its sporulation and affinities. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 53(2), 301–342.
- Awerinzew, S. von (1910) Über die Stellung im System und die Klassifizierung der Protozoen. *Biologisches Centralblatt*, 30(14), 465–475.
- Barns, S.M., Lane, D.J., Sogin, M.L., Bibeau, C. & Weisburg, W.G. (1991) Evolutionary

- relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *Journal of Bacteriology*, 173(7), 2250–2255.
- Beattie, J.M. (1906) *Rhinosporidium kinealyi*: a Sporozoon of the nasal mucous membrane. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 11, 270–275.
- Belou, P. (1903) *Tratado de Parasitología Animal*. Buenos Aires, 526 p.
- Brevis, P., Morales, E., Bravo, J.C., Monasterio, V., Mánques, B., Zaror, L., Abaca, P. & Toloza, L. (2010) Un nuevo caso clínico de rinosporidiosis en Chile. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(4), 183–185.
- Brož, O. (1944) Die Herkunft der Zystenmembran von *Dermocystidium ranae*. *Vestník Československe Spolecnosti Zoologické*, 9, 16–25.
- Brož, O. & Kulda, J. (1954) *Dermosporidium multigranulare* n. sp. parasit z kuže *Rana esculenta*. *Věstník Československé Zoologické Spolecnosti*, 18, 91–97.
- Brož, O. & Přívora, M. (1952) Two skin parasites of *Rana temporaria*: *Dermocystidium ranae* Guyénot & Naville and *Dermosporidium granulosum* n. sp. *Parasitology*, 42(1–2), 65–69.
- Burgess, H.J., Lockerbie, B.P., Czerwinski, S. & Scott, M. (2012) Equine laryngeal rinosporidiosis in western Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(4), 777–780.
- Carini, A. (1940) Sobre um parasito semelhante a um “*Rhinosporidium*”, encontrado em quistos da pele de uma “*Hyla*”. *Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)*, 11, 93–98.
- Cavalier-Smith, T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73, 203–266.
- Červinka, S. & Vítovek, J. (1974) Dermocystidiosis—a gill disease of the carp due to *Dermocystidium cyprinid* n.sp. *Journal of Fish Biology*, 6(6), 689–699.
- Curtois, E.A., Cornuau, J.H., Loyau, A. & Schmeller, D.S. (2013) Distribution of *Amphibiocystidium* sp. in palmate newts (*Lissotriton helveticus*) in Ariège, France. *Herpetology Notes*, 6, 539–543.
- da Silva, J.F., da Silva, W.M., Nogueira, A. de M. & Cavalcante, S.E. (1975) Rinosporidiose nasal – estudo de 11 casos. *Revista de la Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 9(1), 19–25.
- De Beauchamp, M.P. de (1914) L'évolution et les affinités des Protistes du genre *Dermocystidium*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Academie des Sciences (Paris)*, 158, 1359–1360.
- de Mello, M.T. (1943) Rhinosporidiosis. *Mycopathologia*, 4(1), 342–348.
- Duffus, A.L.J. & Cunningham, A.A. (2010) Major disease threats to European amphibians. *Herpetological Journal*, 20(3), 117–127.
- Dunkerly, J.S. (1914) *Dermocystidium pusula* Pérez, parasitic on *Trutta fario*. *Zoologischer Anzeiger*, 44, 179–182.
- Dykova, I. & Lomb, J. (1992) New evidence of fungal nature of *Dermocystidium koi* Hoshina and Sahara, 1950. *Journal of Applied Ichthyology*, 8(1–4), 180–185.
- Ercan, D., Andreou, D., Sana, S., Öntas, C., Baba, E., Top, N., Uğur, K., Tarkan, A.S. & Gozlan, R.E. (2015) Evidence of threat to European economy and biodiversity following the introduction of an alien pathogen on the fungal–animal boundary. *Emerging Microbes and Infections*, 4, e52.
- Elkan, E. (1962) *Dermocystidium gasterostei* n. sp., a parasite of *Gasterosteus aculeatus* L. and *Gasterosteus pungitius* L. *Nature*, 196(4858), 958–960.
- Federici, E., Rossi, R., Fidati, L., Paracucchi, R., Scargetta, S., Montalbani, E., Franzetti, A., La Porta, G., Fagotti, A., Simoncelli, F., Cenci, G. & Di Rosa, I. (2015) Characterization of the skin microbiota in Italian stream frogs (*Rana italica*)

- infected and uninfected by a cutaneous parasitic disease. *Microbes and Environments*, 30(3), 262–269.
- Feist, S.W., Longshaw, M., Hurrell, R.H. & Mander, B. (2004) Observations of *Dermocystidium* sp. infections in bullheads, *Cottus gobio* L., from a river in southern England. *Journal of Fish Diseases*, 27(4), 225–231.
- Feldman, S.H., Wimsatt, J.H. & Green, D.E. (2005) Phylogenetic classification of the frog pathogen *Amphibiothecum* (*Dermosporidium*) *penneri* based on small ribosomal subunit sequencing. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(4), 701–706.
- Fredericks, D.N., Jolley, J.A., Lepp, P.W., Kosek, J.C. & Relman, D.A. (2000) *Rhinosporidium seeberi*: a human pathogen from a novel group of aquatic protistan parasites. *Emerging Infectious Diseases*, 6(3), 273–282.
- Frost, D.R. (2016) Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. Disponible en: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (accedido el 22 de abril de 2016)
- Gambier, H. (1924) Sur un protiste parasite et pathogene des tritons: *Hepatosphera molgarum* n. g., n. sp. *Comptes Rendus des Séances de la Societe de Biologie et de des Filiales*, 90, 439–441.
- Gamble, T. Bauer, A.M., Colli, G.R., Greenbaum, E., Jackman, T.R., Vitt, L.J. & Simons, A.M. (2011) Coming to America: multiple origins of new World geckos. *Journal of Evolutionary Biology*, 24, 231–244.
- Glockling, S.L., Marshall, W.L. & Gleason, F.H. (2013) Phylogenetic interpretations and ecological potentials of the Mesomycetozoea (Ichthyosporea). *Fungal Ecology*, 6, 237–247.
- Goloboff, P.A., Farris, J.S. & Nixon, K.C. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24(5), 774–786.
- González-Hernández, M., Denoël, M., Duffus, A.J.L., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A. & Acevedo-Whitehouse, K. (2010) Dermocystid infection and associated skin lesions in free-living palmate newts (*Lissotriton helveticus*) from Southern France. *Parasitology International*, 59(3), 344–350.
- Goodchild, C.G. (1953) A subcutaneous, cyst-parasite of Bullfrogs: *Histocystidium ranae*, n. g., n. sp. *Journal of Parasitology*, 39(4), 395–405.
- Gozlan, E.R., Saint-Hilaire, S., Feist, S.W., Martin, P. & Kent, M.L. (2005) Biodiversity: disease threat to European fish. *Nature*, 435(7045), 1046.
- Gozlan, R.E., Whipps, C.M., Andreou, D. & Arkush, K.D. (2009) Identification of a rosette-like agent as *Sphaerothecum destruens*, a multi-host fish pathogen. *International Journal of Parasitology*, 39(10), 1055–1058.
- Granata, L. (1919) *Dermomycooides beccarii* n.g n.sp nuovo enigmatico parassita di *Molge vulgaris* L. *Monitore Zoologico Italiano*, 20, 153–160.
- Green, D.E. & Sherman, K.C. (2001) Diagnostic histological findings in Yosemite Toads (*Bufo canorus*) from a die-off in the 1970s. *Journal of Herpetology*, 35(1), 92–103.
- Green, D.E., Converse, K.A. & Schrader, A.K. (2002) Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the U.S.A., 1996–2001. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969, 323–339.
- Gururaja, K.V., Preeti, G., Patil, R.K. & Cunningham, A.A. (2011) Dermal fungal infection in a frog from the Western Ghats, India. *Current Science*, 101(5), 622–623.
- Guyénot, E. & Naville, A. (1922) Un nouveau protiste du genre *Dermocystidium* parasite de la grenouille *Dermocystidium ranae* nov. spec. *Revue Suisse de Zoologie*, 29, 133–145.
- Harrell, L.W., Elston, R.A., Scott, T.M. & Wilkinson,

- M.T. (1986) A significant new systemic disease of net-pen reared Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) brood stock. *Aquaculture*, 55(4), 249–262.
- Hassan, M.A., Osman, H.A.M. & Mahmoud, M.A. (2014) Studies on dermocystidiosis (Yellow Muscle Disease) among some marine fishes of Arabian Gulf and Red Sea coast, Jeddah, Saudi Arabia. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 22(4), 478–487.
- Herr, R.A., Ajello, L., Taylor, J.W., Arseculeratne, S.N. & Mendoza, L. (1999) Phylogenetic analysis of *Rhinosporidium seeberi*'s 18S small-subunit ribosomal DNA groups this pathogen among members of the Protoctistan Mesomycetozoa Clade. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), 2750–2754.
- Hertel, L.A., Bayne, C.J. & Loker, E.S. (2002) The symbiont *Capsaspora owczarzaki*, nov. gen. nov. sp., isolated from three strains of the pulmonate snail *Biomphalaria glabrata* is related to members of the Mesomycetozoea. *International Journal of Parasitology*, 32(9), 1183–1191.
- Hoshina T. & Sahara Y. (1950) A new species of the genus *Dermocystidium*, *D. koi* sp. nov., parasitic in *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 15(12), 825–829.
- Jay, J.M. & Pohley, J.W. (1981) *Dermosporidium penneri* sp. n. from the skin of the American Toad, *Bufo americanus* (Amphibia: Bufonidae). *Journal of Parasitology*, 67(1), 108–110.
- Katoh, K. & Standley, D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780.
- Kennedy, F.A., Buggage, R.R. & Ajello, L. (1995) Rhinosporidiosis: a description of an unprecedented outbreak in captive swans (*Cygnus* spp.) and a proposal for revision of the ontogenic nomenclature of *Rhinosporidium seeberi*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 33(3), 157–165.
- Kerk, D., Gee, A., Standish, M., Wainwright, R.O., Drum, A.S., Elston, R.A. & Sogin, M.L. (1995) The rosette agent of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) is closely related to choanoflagellates, as determined by the phylogenetic analyses of its small ribosomal subunit RNA. *Marine Biology*, 122(2), 187–192.
- Laveran, A. & Pettit, A. (1910) Sur une épizzotie des truites. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Academie des Sciences (Paris)*, 151, 421–423.
- Leeming, G., Hetzel, U., Campbell, T. & Kipar, A. (2007) Equine rhinosporidiosis: an exotic disease in the UK. *Veterinary Record*, 160(16), 552–554.
- Léger, M.L. (1914) Sur un nouveau Protiste du genre *Dermocystidium* parasite de la Truite. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Academie des Sciences (Paris)*, 158, 807–809.
- Lengfelder, K.D. & Pospischil, A. (1980) Rhinosporidiose beim Pferd. Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung eines Falles. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, 27, 326–339.
- Luciani, C.A. & Toledo, H.O. (1989) *Rhinosporidium seeberi* en bovinos criollos (*Bos taurus*). *Veterinaria Argentina*, 6(57), 451–455.
- Mendoza, L., Ajello, L. & Taylor, J.W. (2001) The taxonomic status of *Lacazia loboi* and *Rhinosporidium seeberi* has been finally resolved with the use of molecular tools. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18(3), 95–98.
- Mendoza, L., Herr, R.A. & Ajello, L. (2001a) Author's reply. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(1), 413–415.
- Mendoza, L., Taylor, J.W. & Ajello, L. (2002) The Class Mesomycetozoea: a heterogeneous group of microorganisms at the Animal-Fungal

- boundary. *Annual Review of Microbiology*, 56, 315–344.
- Minchin, E.A. & Fantham, H.B. (1905) *Rhinosporidium kinealyi*, n.g., n.sp., a new sporozoön from the mucous membrane of the septum nasi of man. *Quarterly Journal of Microbiological Science*, 49(3), 521–532.
- Moral, H. (1913) Über das Auftreten von *Dermocystidium pusula* (Pérez), einem einzelligen Parasiten der Haut des Molches bei *Triton cristatus*. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 81, 381–393.
- Niño, F.L. & Freire, R.S. (1964) Existencia de un foco endémico de rinosporidiosis en la Provincia del Chaco. V. Estudio de nuevas observaciones y consideraciones finales. *Mycopathologia*, 24(2), 92–102.
- Negróni, R. (2011) Historia del descubrimiento de la coccidioidomycosis. *Revista Argentina de Dermatología*, 92(3). Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-300X2011000300001&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2011000300001&lng=es&nrm=iso) (accedido el 3 setiembre 2015)
- Netto, J.A. & Furtado, T. (1973) La rinosporidiosis en el Brasil. Observación d'un cas de localisation oculaire. *International Journal of Dermatology*, 12(2), 110–114.
- Parodi, S. (1930) La rinosporidiosis en Sudamérica. *Medicina de los Países Cálidos*, 3(1), 55–62 (consultado resumen).
- Pascolini, R., Daszak, P., Cunningham, A.A., Tei, S., Vagnetti, D., Bucci, S., Fagotti, A. & Di Rosa, I. (2003) Parasitism by *Dermocystidium ranae* in a population of *Rana esculenta* complex in Central Italy and description of *Amphibiocystidium* n. gen. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(1), 65–74.
- Peeler, E.J., Oidtmann, B.C., Midtlyng, P.J., Miossec, L. & Gozlan, R.E. (2011) Non-native aquatic animals introductions have driven disease emergence in Europe. *Biological Invasions*, 13(6), 1291–1303.
- Pekkarinen, M., Lom, J., Murphy, C.A., Ragan, M.A. & Dyková, I. (2003) Phylogenetic position and ultrastructure of two *Dermocystidium* species (Ichthyosporea) from the Common Perch (*Perca fluviatilis*). *Acta Protozoologica*, 42(4), 287–307.
- Pereira, C.N., Di Rosa, I., Fagotti, A., Simoncelli, F., Pascolini, R. & Mendoza, L. (2005) The pathogen of frogs *Amphibiocystidium ranae* is a member of the Order Dermocystida in the Class Mesomycetozoa. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), 192–198.
- Pérez, C. (1907) *Dermocystis pusula* organisme nouveau parasite de la peau des tritons. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de des Filiales (Paris)*, 63, 445–446.
- Pérez, C. (1908) Rectification de nomenclature à propos de *Dermocystis pusula*. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de des Filiales (Paris)*, 64, 738.
- Pérez, C. (1913) *Dermocystidium pusula*. Parasite de la peau des Tritons. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 52, 343–357.
- Poisson, R. (1937) Sur une nouvelle espèce du genre *Dermomycoïdes* Granata 1919: *Dermomycoïdes armoriacus* Poisson 1936 parasite cutané de *Triturus palmatus* (Schneider): genèse et structure de la zoospore. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique (Woods Hole)*, 71, 91–116.
- Raffel, T.R., Bommarito, T., Barry, D.S., Witiak, S.M. & Shackelton, L.A. (2008) Widespread infection of the Eastern red-spotted newt (*Notophthalmus viridescens*) by a new species of *Amphibiocystidium*, a genus of fungus-like mesomycetozoan parasites not previously reported in North America. *Parasitology*, 135(2), 203–215.
- Ragan, M.A., Goggin, C.L., Cawthorn, R.J., Cerenius,

- L., Jamieson, A.V.C., Plourde, S.M., Rand, T.G. & Gutell, R.R. (1996) A novel clade of protistan parasites near the animal-fungal divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 93(21), 11907–11912.
- Ramachandra Rao, P.V., Jain, S.N. & Hanumantha Rao, T.V. (1975) Animal rhinosporidiosis in India with case reports. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 55, 119–124.
- Remy, P. (1931) Presence de *Dermocystidium ranae* (Guyénot et Naville) chez une *Rana esculenta* L. de Lorraine. *Annals de Parasitologie*, 9, 1–3.
- Ridewood, W.G. & Fantham, H.B. (1907) On *Neurosporidium cephalodisci*, n.g., n. sp., a sporozoon from the nervous system of *Cephalodiscus nigrescens*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 51, 201–204.
- Rolon, P.A. (1974) Rinosporidiosis. Epidemiología en la República del Paraguay. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 52(3–4), 155–171.
- Romero, A., Quevedo, H. & Ríos, D.A. (2008) Rinosporidiosis nasal equina: descripción de un caso. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud (Formosa)*, 2(2), 17–20.
- Rowley, J.J.L., Gleason, F.H., Andreou, D., Marshall, W.L., Lilje, O. & Gozlan, R. (2013) Impacts of mesomycetozoean parasites on amphibian and freshwater fish populations. *Fungal Biology Reviews*, 27(3–4), 100–111.
- Scheid, P., Balczun, C., Dehling, J.M., Ammon, A. & Sinsch, U. (2015) Rhinosporidiosis in African reed frogs *Hyperolius spp.* caused by a new species of *Rhinosporidium*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 115(2), 111–120.
- Seeber, G.R. (1900) *Un nuevo esporozoario parásito del hombre. Dos casos encontrados en pólipos nasales*. Tesis de grado, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Buenos Aires, Buenos Aires, 65 p.
- Silva, V., Pereira, C.N., Ajello, L. & Mendoza, L. (2005) Molecular evidence for multiple host-specific strains in the genus *Rhinosporidium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1865–1868.
- Spanggaard, B., Skouboe, P., Rossen, L. & Taylor, J.W. (1996) Phylogenetic relationships of the intercellular fish pathogen *Ichthyophonus hoferi* and fungi, choanoflagellates and the rosette agent. *Marine Biology*, 126(1), 109–115.
- Stachowsky, L. (1959) Rinosporidiosis (breve resumen de los conocimientos actuales). IV Congreso Venezolano de Tisiología y Neumología, Valencia, Estado de Carabobo (8–12 diciembre 1959).
- Stafford, M.A. (1905) Trematodes from Canadian vertebrates. *Zoologischer Anzeiger*, 28, 681–694.
- Stark, T. & Guex, G.D. (2014) Infecties bij amfi bieën in Nederland: *Amphibiocystidium*. *Ravon*, 16, 54–56.
- Thankamani, V. & Lipin Dev, M.S. (2012) *Rhinosporidium seeberi* proven as a fungus for the first time after a century since its discovery. *Research in Biotechnology*, 3(1), 41–46.
- Vélez, A., Salazar, G.I. & Monsalve, P. (2011) Rinosporidiosis ocular, presentación de tres casos y revisión de la literatura científica. *Infectio*, 15(3), 202–204.
- Vilela, R. & Mendoza, L. (2012) The taxonomy and phylogenetics of the human and animal pathogen *Rhinosporidium seeberi*: A critical review. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(4), 185–199.
- Weiser, J. (1949) Parasites of fresh-water fish II. *Věstník Československé Zoologické Společnosti*, 13, 364–371.





## Rinosporidiosis en *Hypsiboas pulchellus*

### Resumen

En este Capítulo se describe la infección por *Rhinosporidium rwandae* (Dermocystida) en anuros de la especie *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) de Uruguay. La misma se presenta principalmente como una infección cutánea, nodular y ulcerativa. Los ejemplares presentaron usualmente de uno a tres nódulos, con predilección por las regiones abdominal, pectoral y pericloacal. Los esporangios son esféricos (300–800  $\mu\text{m}$ ), se ubican en la dermis, con una cápsula de aproximadamente 3–15  $\mu\text{m}$ . Las endosporas miden 4–9  $\mu\text{m}$  y su citoplasma presenta usualmente una gran inclusión. La infección fue más frecuente en otoño, con menor prevalencia en invierno y primavera, y no se detectó en el verano. En condiciones de laboratorio la enfermedad fue autolimitante y algunos intentos de transmisión directa fueron infructuosos. En numerosos ejemplares se observó coinfección con el hongo patógeno de anfibios *Batrachochytrium dendrobatidis*. El diagnóstico diferencial de infección por dermatocistidios en *H. pulchellus* tuvo en cuenta principalmente manchas y pliegues cutáneos no patológicos, heridas, cicatrices, y parasitosis cutánea por ácaros (Trombiculidae). Las características macro y microscópicas de esta enfermedad así como su presentación estacional, se asemejan a lo reportado para otras especies de anfibios.

## Introducción

Las enfermedades de la piel en poblaciones silvestres de anfibios neotropicales han sido escasamente estudiadas, salvo por la quitridiomycosis, causada por el hongo quitridiomyceto *Batrachochytrium dendrobatidis* (ver Capítulos 3 y 4). En Uruguay, su hallazgo en especies nativas es reciente (Borteiro *et al.* 2009). Otras enfermedades infecciosas de la piel de los anfibios en condiciones naturales no habían sido reportadas en especies nativas hasta el presente estudio. En el Capítulo precedente se cita el hallazgo de infección por microorganismos unicelulares pertenecientes al Orden Dermocystida (Ichthyosporrea) en anfibios de Uruguay. Estos parásitos de vertebrados afectan principalmente la piel y mucosas, y son patógenos de importancia en medicina humana y veterinaria por causar enfermedades crónicas potencialmente letales; sin embargo su estudio se ha visto muy limitado debido a que la mayoría son resistentes al cultivo *in vitro* (Vilela & Mendoza 2012; Arseculeratne & Mendoza 2005). El diagnóstico de la infección se realiza usualmente por histología convencional (Glockling *et al.* 2013). El patógeno más estudiado del grupo es *Rhinosporidium seeberi*, una especie cosmopolita que causa una enfermedad granulomatosa en el hombre y otros hospedadores homeotermos (Ashworth 1924; Karunaratne 1936; de Mello 1943). La rinosporidiosis se caracteriza por el desarrollo de pólipos principalmente en narinas y conjuntiva ocular, y es de gran importancia epidemiológica en medicina humana en algunas zonas de Asia (Arseculeratne & Mendoza 2005; Vilela & Mendoza 2012). En peces, diversas especies de *Dermocystidium* son importantes patógenos con el potencial de causar enfermedad severa (Rowley *et al.* 2013).

Los dermocistidios parásitos de anfibios han sido asociados a episodios de morbilidad y mortalidad en Europa y Norteamérica (Pascolini *et al.* 2003; Raffel *et al.* 2008). Su ciclo de vida, incluidos los mecanismos de transmisión e infección son virtualmente desconocidos (Pascolini *et al.* 2003; González-Hernández *et al.* 2010). Algunas especies de *Dermocystidium* parásitas de peces producen zoosporas flageladas que infectan al hospedador y se enquistan en los tejidos. Cuando las formas infectantes ingresan al hospedador y alcanzan los tejidos blanco, desarrollan esporangios capsulados que dan origen a numerosas endosporas, que a su vez pueden liberarse y repetir el ciclo dentro del hospedador (Mendoza *et al.* 2002). La formación de esporas de vida libre al parecer son producidas también por *Dermomycooides armoriacus* parásito de anfibios (Poisson 1937).

Los anfibios infectados pueden reconocerse por la presencia de pequeños nódulos en la piel, que al examen histológico presentan esporangios en el estrato esponjoso de la dermis, usualmente son esféricos, con numerosas endosporas (Pascolini *et al.* 2003; Raffel *et al.* 2008). Estos microorganismos miden entre 7 y 12  $\mu\text{m}$  y el citoplasma está generalmente ocupado por una gran inclusión que desplaza los demás componentes (citoplasma “crescent-shaped”; Jay & Pohley 1981; Pascolini *et al.* 2003; Raffel *et al.* 2008). Cuando los parásitos se han multiplicado y los esporangios maduran, éstos se abren al exterior apareciendo una úlcera en la piel por la cual se liberan las endosporas. Se desconoce el ciclo ulterior. Los reportes de enfermedad en órganos internos son raros (Raffel *et al.* 2008).

La infección por dermocistidios en anfibios del Uruguay se descubrió durante el transcurso del presente estudio, y en el capítulo anterior los microorganismos causantes de esta afección fueron identificados como *Rhinosporidium rwandae*. En esta sección se describen las lesiones macroscópicas causadas por este patógeno en el anuro *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae), el diagnóstico histológico, algunas sus características microbiológicas, y se estudian aspectos epidemiológicos básicos de la enfermedad.

## Objetivos

### Objetivo general

Describir la infección por *Rhinosporidium rwandae* (Dermocystida) en el anuro *Hypsiboas pulchellus* de Uruguay.

### Objetivos específicos

- 1) Identificar las lesiones macro y microscópicas características de la enfermedad.
- 2) Describir la morfología de los microorganismos involucrados.
- 3) Investigar la ocurrencia de variación estacional en la infección.

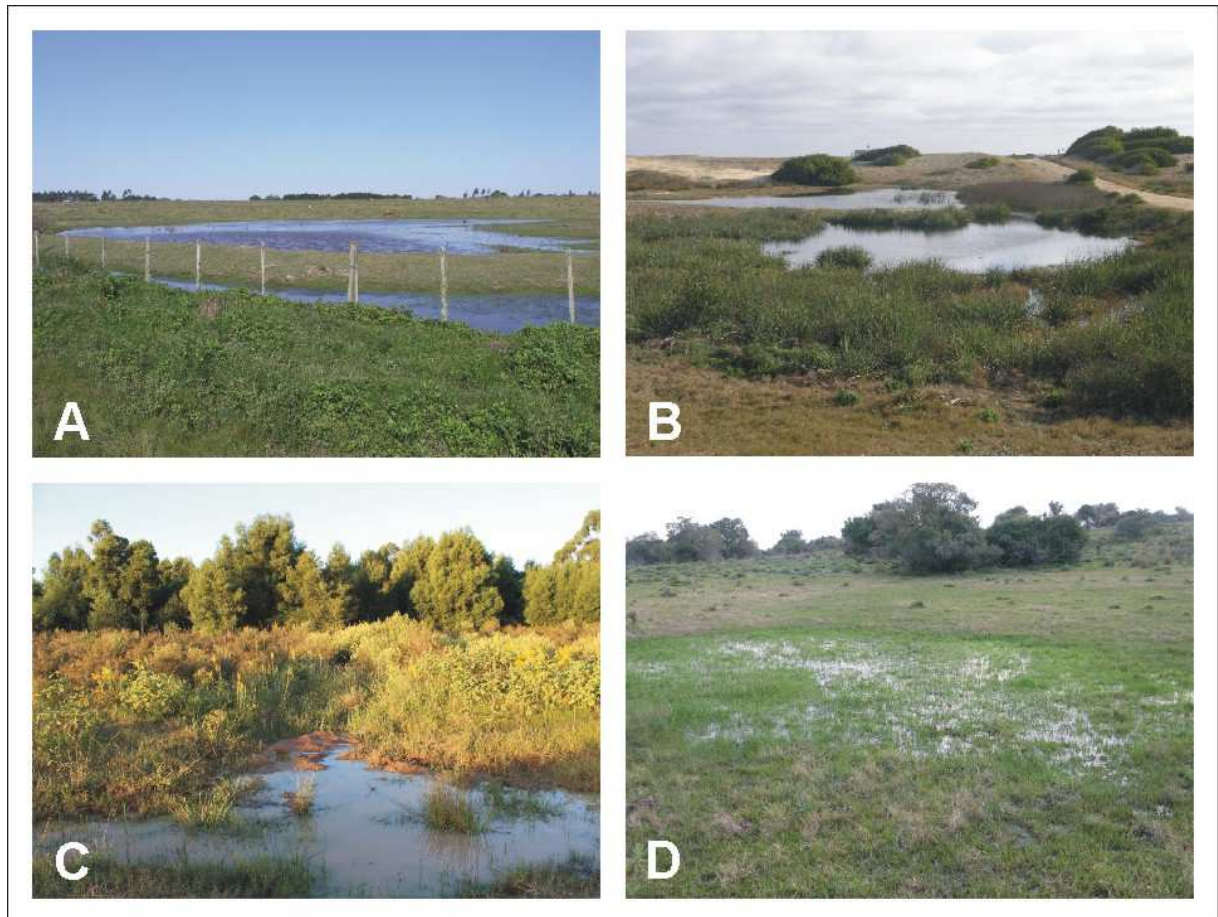
- 4) Obtener una aproximación a la especificidad de hospedador.
- 5) Evaluar su asociación con infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*.
- 6) Discutir la importancia de estos hallazgos para la conservación de anfibios nativos.

## **Materiales y Métodos**

### **Sitios de estudio**

Los sitios de estudio se ubicaron en cuatro localidades del sur y este de Uruguay, dos de ellas pertenecientes a la unidad de paisaje de Serranías, en los alrededores de Valentines (33°15'11" S, 55°06'36" W), Dpto. de Treinta y Tres, y proximidades del Río Tacuarí (32°32'45" S, 54°05'47" W), Dpto. de Cerro Largo. Otros dos sitios muy próximos entre sí, pertenecen a la unidad de paisaje Arenales Costeros del Sur, en La Paloma (34°38'29" S, 54°12'39" W) y la Laguna de Rocha (34°39'45" S, 54°13'14" W), Dpto. de Rocha.

Los hábitats muestreados fueron en cuerpos de agua naturales y artificiales. En La Paloma se trabajó en un cuerpo de agua artificial permanente (tajamar) con escasa vegetación herbácea utilizado como abrevadero de ganado en una zona de praderas. El mismo mide unos 70 x 30 m y tiene una profundidad máxima cercana a los 2 m, figura 7.1 A. En la Laguna de Rocha el ambiente es un sistema de humedales con charcos temporales, semipermanentes y permanentes entre dunas costeras fijas muy próximo a la costa oceánica, figura 7.1 B. La vegetación en los alrededores es herbácea con parches de *Acacia*, y en los cuerpos de agua se destaca la presencia de *Eryngium* y *Juncus*. La profundidad máxima en el cuerpo de agua principal es de aproximadamente 1,3 m. En Valentines y el Río Tacuarí, los ambientes se encuentran en paisajes de serranías. En el primer caso el tapiz vegetal es de praderas naturales con escasa vegetación arbórea nativa. Los ejemplares de *Hypsiboas* se colectaron en un cuerpo de agua temporal pequeño de forma irregular, de unos 50 cm de profundidad, ubicado dentro de matorrales de pradera y contiguo a un parche de forestación con *Eucalyptus*, figura 7.1 C. En el Río Tacuarí el cuerpo de agua muestreado fue un charco temporal de unos 20 m de diámetro y no más de 20 cm de profundidad en un área de praderas naturales con monte nativo serrano de tipo parque, figura 7.1 D.



**FIGURA 7.1.** Sitios de colecta de ejemplares de *Hysiboas pulchellus* que presentaron infección por *Rhinosporidium rwandae* en Uruguay. **A**, tajamar en los alrededores de La Paloma, Dpto. de Rocha (30/IX/2012). **B**, charcos costeros temporales y semipermanentes en la Laguna de Rocha, Dpto. de Rocha (15/VIII/2010). **C**, charco temporal en Valentines, Dpto. de Treinta y Tres (22/III/2014). **D**, charco temporal en las cercanías del Río Tacuarí, Dpto. de Cerro Largo (24/VIII/2012). Las fechas corresponden a la captura de las imágenes.

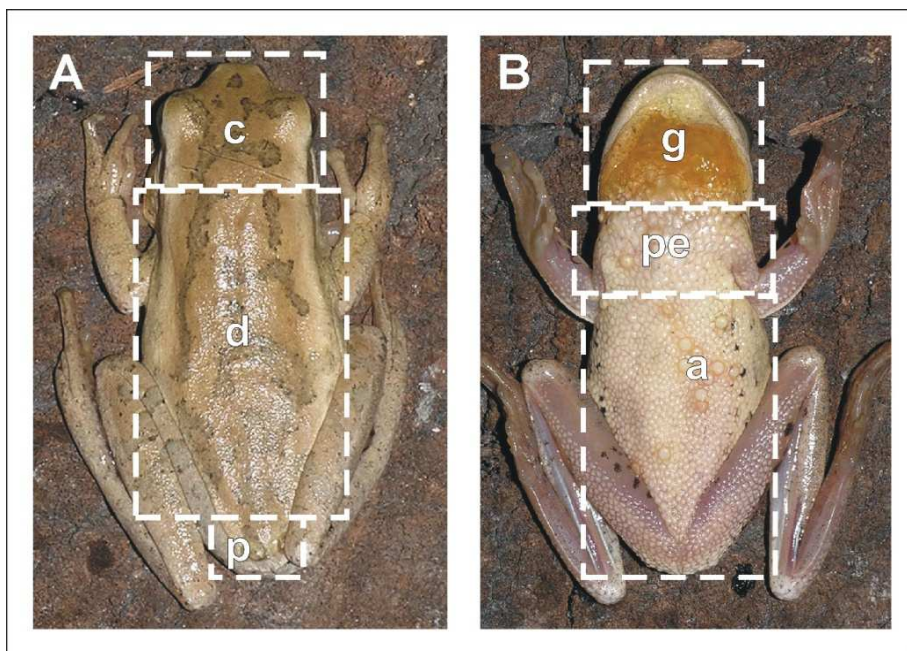
## Muestreo y colecta de ejemplares

Se colectaron ejemplares de *Hysiboas pulchellus* y de otras especies de anfibios presentes en los sitios de estudio (ver Apéndice 2). Los acrónimos utilizados corresponden a los indicados en el Capítulo 2. En la población de *H. pulchellus* de los alrededores de La Paloma/Laguna de Rocha se pudieron realizar 6 muestreos adicionales durante el período setiembre de 2012 y abril de 2014 en diferentes estaciones del año, estudiándose un total de 139 ejemplares adultos. En un estudio previo se detectaron en este sitio casos de infección por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en larvas de anfibios, incluidos ejemplares de *H. pulchellus* (Borteiro *et al.* 2009). Por este motivo se registró simultáneamente la prevalencia de la

infección por este hongo y dermocistidios (individuos infectados/individuos colectados). Las prevalencias en cada estación se calcularon mediante el método de Wilson y se compararon mediante el test exacto de Fisher para pequeñas muestras, como se explica en el Capítulo 3, considerando un nivel de significación de 0,05 para rechazar la hipótesis nula de que la prevalencia en las distintas estaciones no difiere. La correlación entre ambas infecciones se evaluó mediante el coeficiente  $r$  de Spearman. Se asumió independencia entre los muestreos ya que los individuos colectados en cada uno no se liberaron, y el número de individuos por muestra fue pequeño en relación al número total de individuos presentes. Para los análisis se utilizó el programa STATISTICA 6.0<sup>®</sup>.

## Registro de lesiones macroscópicas y análisis

Para el registro de lesiones cutáneas se consideraron distintas regiones corporales: (1) dorsal, (2) cabeza, (3) gular, (4) pectoral, (5) abdominal, (6) pericloacal, figura 7.2.



**FIGURA 7.2.** *Hypsiboas pulchellus*, regiones anatómicas del tronco consideradas. **A**, en el dorso: c, cabeza; d, dorso; p, región pericloacal. **B**, en el vientre: g, región gular; pe, región pectoral; a, abdomen.

Las frecuencias de lesiones cutáneas de cada región anatómica se compararon mediante el test de Chi-cuadrado con 1 gl, utilizando como frecuencias esperadas el número total de nódulos, corregido por la fracción de superficie corporal que cada región representa (Raffel *et al.* 2008). La superficie corporal de cada región se estimó sobre fotografías digitales de ejemplares fijados, utilizando el programa Image J 1.45<sup>®</sup> (Abràmoff *et al.* 2004; disponible en: <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>). A todos los ejemplares de *Hypsiboas pulchellus* se les practicó una inspección post-mortem para observar la presencia de lesiones en órganos de la cavidad celómica, sin extracción de las vísceras.

## **Histología y microscopía electrónica**

Se realizaron preparaciones histológicas con muestras de tejidos que presentaron lesiones nodulares, fundamentalmente piel. Las muestras se tomaron mediante disección bajo lupa binocular, y se mantuvieron en el mismo líquido fijador de los especímenes disecados hasta su procesamiento y análisis microscópico. Las tinciones utilizadas fueron H&E, Gram y PAS. Los procedimientos se detallan en el Capítulo 2. A los efectos comparativos se hicieron preparaciones histológicas de piel de individuos en apariencia sanos o en su defecto de zonas libres de lesiones.

Algunos nódulos de piel se disecaron para estudios de microscopía electrónica de transmisión, aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> de tejido fue fijado en 3 % glutaraldehído, luego transferido a tetróxido de osmio 1 %, deshidratado en etanol e incluido posteriormente en resina epoxi. Cortes ultrafinos de estas muestras fueron teñidos con citrato de plomo y acetato de uranilo, y luego examinados en un microscopio electrónico modelo JEM100CX (Japón), en el Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable”, Montevideo.

## **Estudios microbiológicos adicionales**

Se utilizó el contenido de algunos nódulos para intentar cultivar los microorganismos presentes y reproducir la enfermedad. Inmediatamente luego de ser sacrificado un ejemplar portador de la infección (MNHN 9479), se disecaron nódulos con instrumental estéril. El contenido de los mismos fue sembrado en varios medios de cultivo agar sangre y agar sabourea. Las colonias desarrolladas se estudiaron mediante frotis teñidos con tinción 15.



Éstos se compararon con frotis realizados por aplastamiento, obtenidos de nódulos de piel del ejemplar MNHN 9477.

El contenido de otros nódulos fue frotado sobre la piel de dos ejemplares de *Hypsiboas pulchellus* en apariencia sanos. Un tercer ejemplar se mantuvo 48 hs semisumergido en un pequeño recipiente con un volumen de suero fisiológico de aproximadamente 10 x 4 x 1 cm al que se adicionó el contenido de un nódulo recién disecado. Los tres ejemplares fueron mantenidos en acua-terrarios por aproximadamente dos meses.

## Resultados

### Presentación de la enfermedad y lesiones macroscópicas

La casi totalidad de los ejemplares de *Hypsiboas pulchellus* estudiados fueron machos adultos, que se capturaron mientras vocalizaban en sitios utilizados por la especie para la reproducción. Los especímenes afectados por la dermatopatía nodular ulcerativa fueron identificados debido a la presencia de nódulos cutáneos presentes en número variable. Los mismos estaban aparentemente en buen estado general, y no se encontraron individuos emaciados, con posturas o comportamientos anormales. Tampoco se detectaron en los sitios de estudio ejemplares moribundos o muertos de *H. pulchellus* u otras especies de anuros afectados por la enfermedad.

Los ejemplares afectados de *Hypsiboas pulchellus* presentaron nódulos cutáneos tanto en la piel de regiones dorsales como ventrales. El individuo más afectado (MNHN 9477) tenía aproximadamente 100 nódulos, la mayoría de ellos en piel de las regiones dorsales: 18 en la región dorsal de la cabeza, 57 en el dorso, 3 en la región gular, 6 en la región pectoral, 5 en abdomen y un acúmulo de numerosos nódulos pericloacales (ver figura 7.5 A). En el resto de los ejemplares con nódulos en piel (n = 22) el número de éstos varió entre 1 y 30, pero la mayoría presentó 1, 2 o 3 nódulos (13/25; 52,0 %), figura 7.3.

La gran mayoría de los ejemplares (24/26, 92,3 %) presentó nódulos en las regiones de piel ventrales (gular, pectoral, abdominal), solamente dos de ellos presentaron nódulos únicamente en el dorso (7,7 %). La mayoría de los individuos con nódulos ventrales (58,3 %, 14/24) tenía además nódulos en regiones dorsales (dorso y pericloacal). No se observaron nódulos en los miembros.

En el conjunto de individuos con lesiones cutáneas capturados entre abril de 2013 y abril de 2014 en La Paloma/Laguna de Rocha (n = 22), se contabilizaron 120 nódulos de piel. La distribución de los mismos fue asimétrica entre regiones anatómicas consideradas. Los nódulos se presentaron con predilección por las regiones pericloacal en la piel dorsal, y en las regiones pectoral y abdominal en la piel ventral. La frecuencia de nódulos observada cada región corporal y la superficie relativa de las mismas se indica en la figura 7.4.

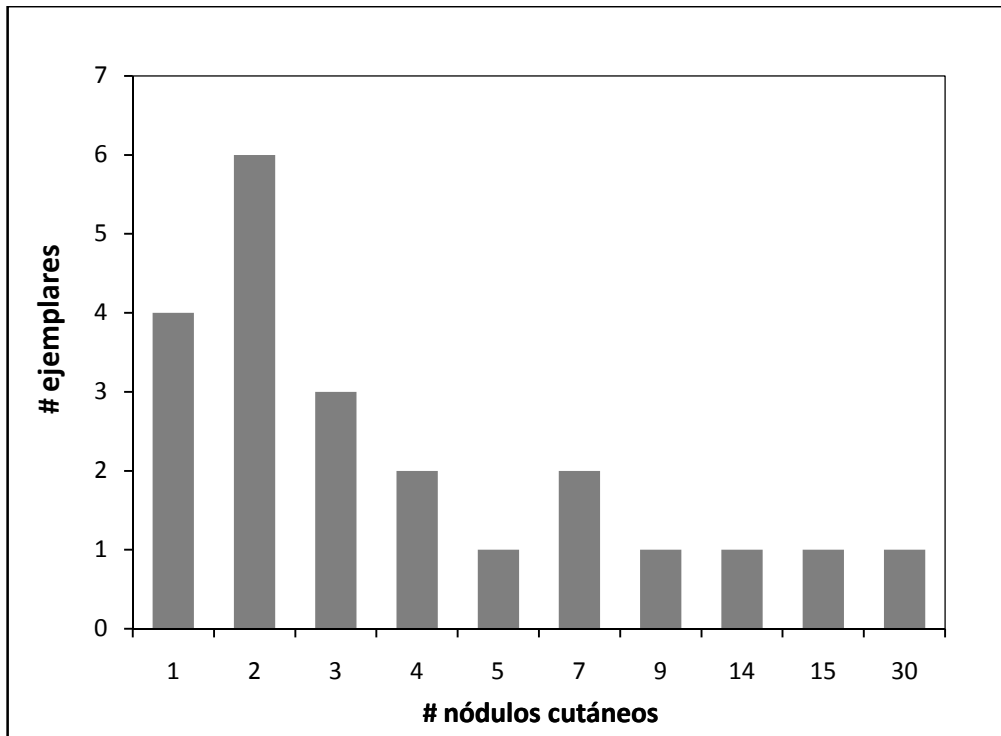
Los nódulos cutáneos tienen un aspecto variable durante su maduración, son en principio redondeados, elevados con respecto a la piel circundante y firmes a la presión, figura 7.5 A y B. Posteriormente comienza el proceso de ulceración de la piel sobre el nódulo y puede verse una región central blanquecina o grisácea correspondiente a la úlcera en vías de formación, lo cual es bien evidente con magnificación. En piel dorsal se observa a veces una zona más oscura correspondiente a la piel que comienza a necrosarse sobre la superficie del nódulo. Luego de la maduración y ulceración del nódulo tendría lugar la liberación de las endosporas. Un ejemplar infectado (MNHN 9479) fue mantenido en cautiverio durante aproximadamente dos semanas, y en el transcurso de unos pocos días los nódulos comenzaron a reducirse hasta dejar cicatrices apenas visibles, comparar figuras 7.5 C y D. Algunas imágenes del proceso de maduración de los nódulos cutáneos se muestran en la figuras 7.5 E-J.

Los nódulos miden desde aproximadamente 0,5 mm cuando son aún inmaduros hasta 2 mm en el caso de los ya ulcerados. A la disección su contenido es blanquecino, de aspecto húmedo y granular. La presencia de uno o escasos nódulos puede pasar fácilmente inadvertida para el observador en un examen a simple vista, aún en ejemplares vivos o recién fijados. La presencia de nódulos de pequeño tamaño puede ser difícil de detectar en ejemplares fijados. El examen de especímenes debe realizarse cuidadosamente con la ayuda de lupa binocular.

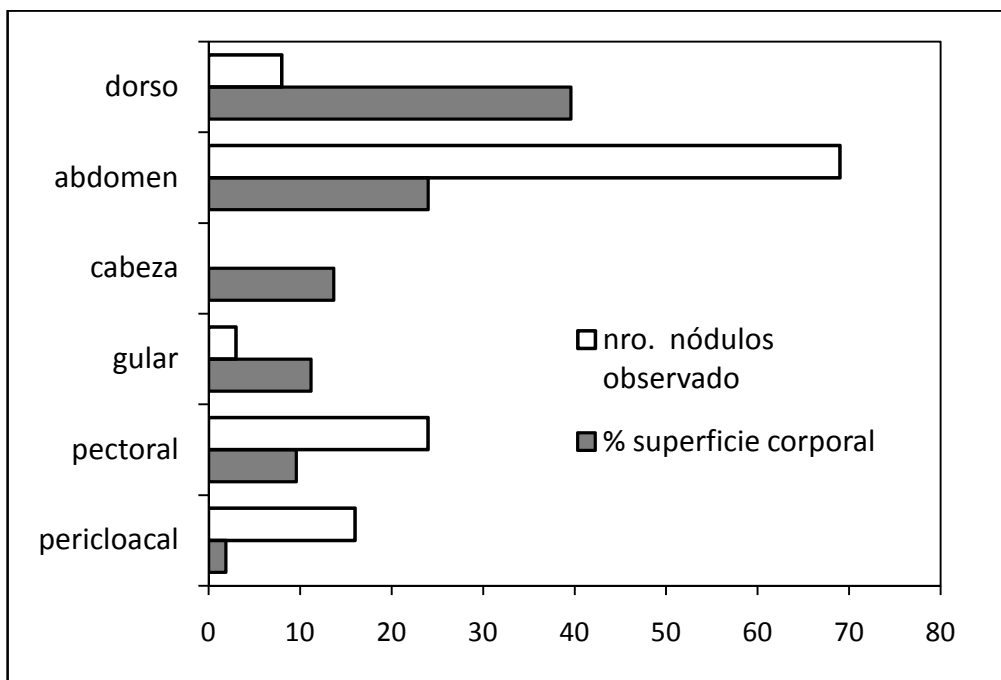
Los intentos de cultivo y de transmisión horizontal de la enfermedad entre ejemplares de *Hypsiboas pulchellus* mantenidos en el laboratorio fueron infructuosos.

## **Histopatología de la piel**

Al examen histológico los nódulos cutáneos presentaron esporangios aproximadamente esféricos, con un eje mayor entre 300 y 800  $\mu\text{m}$ , ubicados en el estrato compacto de la dermis.



**FIGURA 7.3.** Infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*, distribución de frecuencias de nódulos cutáneos por ejemplar (n = 22), La Paloma/Laguna de Rocha, IV 2013 - IV 2014.



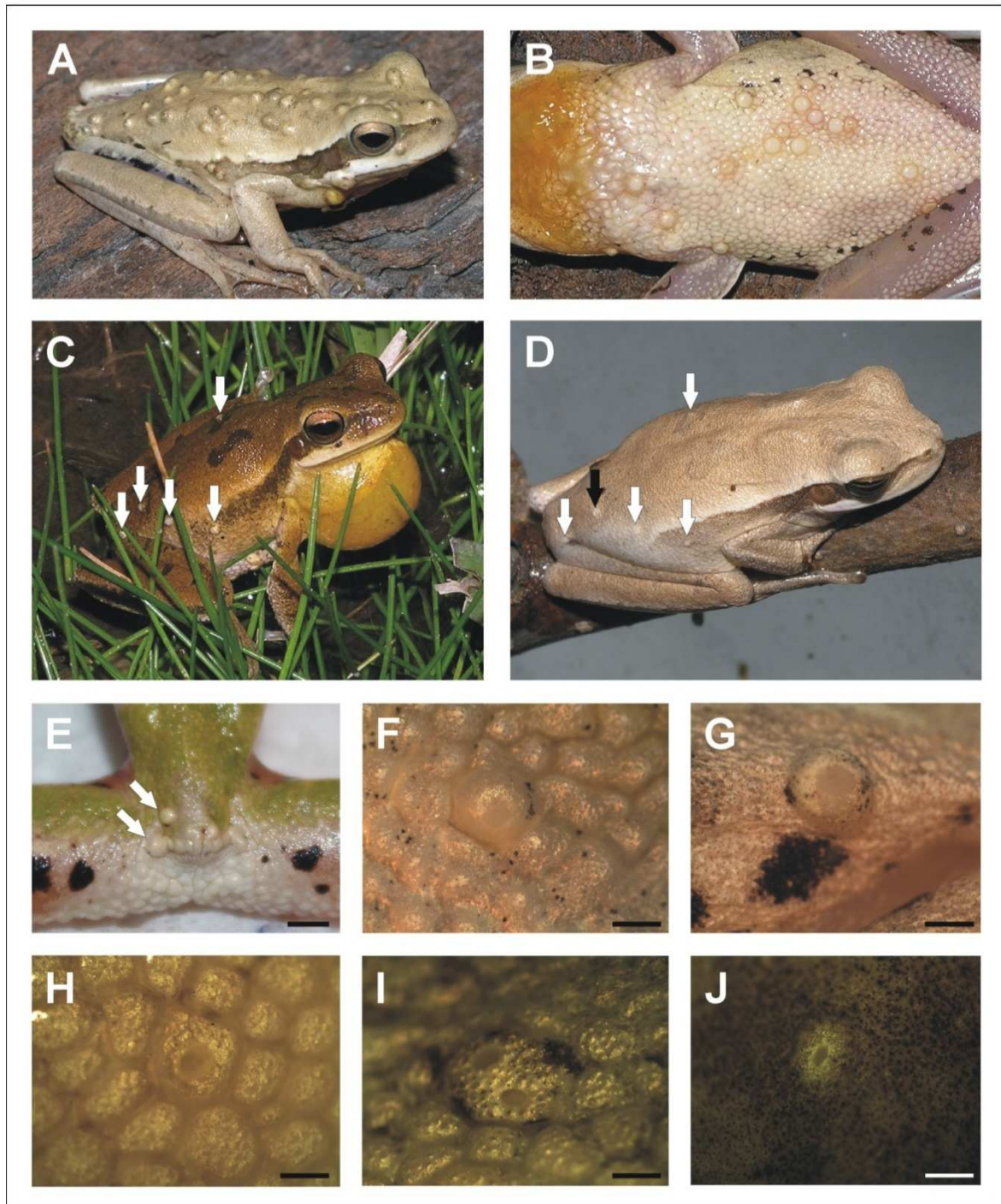
**FIGURA 7.4.** Infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*, distribución de nódulos por región anatómica y porcentaje de superficie corporal de cada una representa (n = 22).

Los esporangios pueden aparecer aislados o en grupos, tienen una cápsula de 5 a 8  $\mu\text{m}$  (3–15) de espesor, y están repletos de endosporas de 4–9  $\mu\text{m}$  de eje mayor, figura 7.6. No se observaron endosporas fuera de los esporangios, salvo por artefactos de la técnica histológica, figura 7.6 A y B. Dentro de los esporangios se pueden observar zonas con una aparente mayor densidad de endosporas, que posiblemente correspondan a artefactos en las láminas, figura 7.6 A-C. La cápsula es levemente basófila con la tinción H&E, GRAM negativa y PAS negativa, ver figuras 7.6 C, 7.7 A-C y 7.9 D. Las esporas son relativamente refractarias a estas tinciones, pero adquieren un tinte levemente basófilo con H&E, son GRAM negativas y PAS negativas, ver figuras 7.7 A-D. No se observó reacción inflamatoria granulomatosa en la piel o infección bacteriana secundaria. En frotis realizados por aplastamiento utilizando nódulos del ejemplar MNHN 9477 previamente fijado en formol y preservado en alcohol 70 % v/v, se observaron numerosos restos de paredes celulares de microorganismos (“tecas”), figura 7.8.

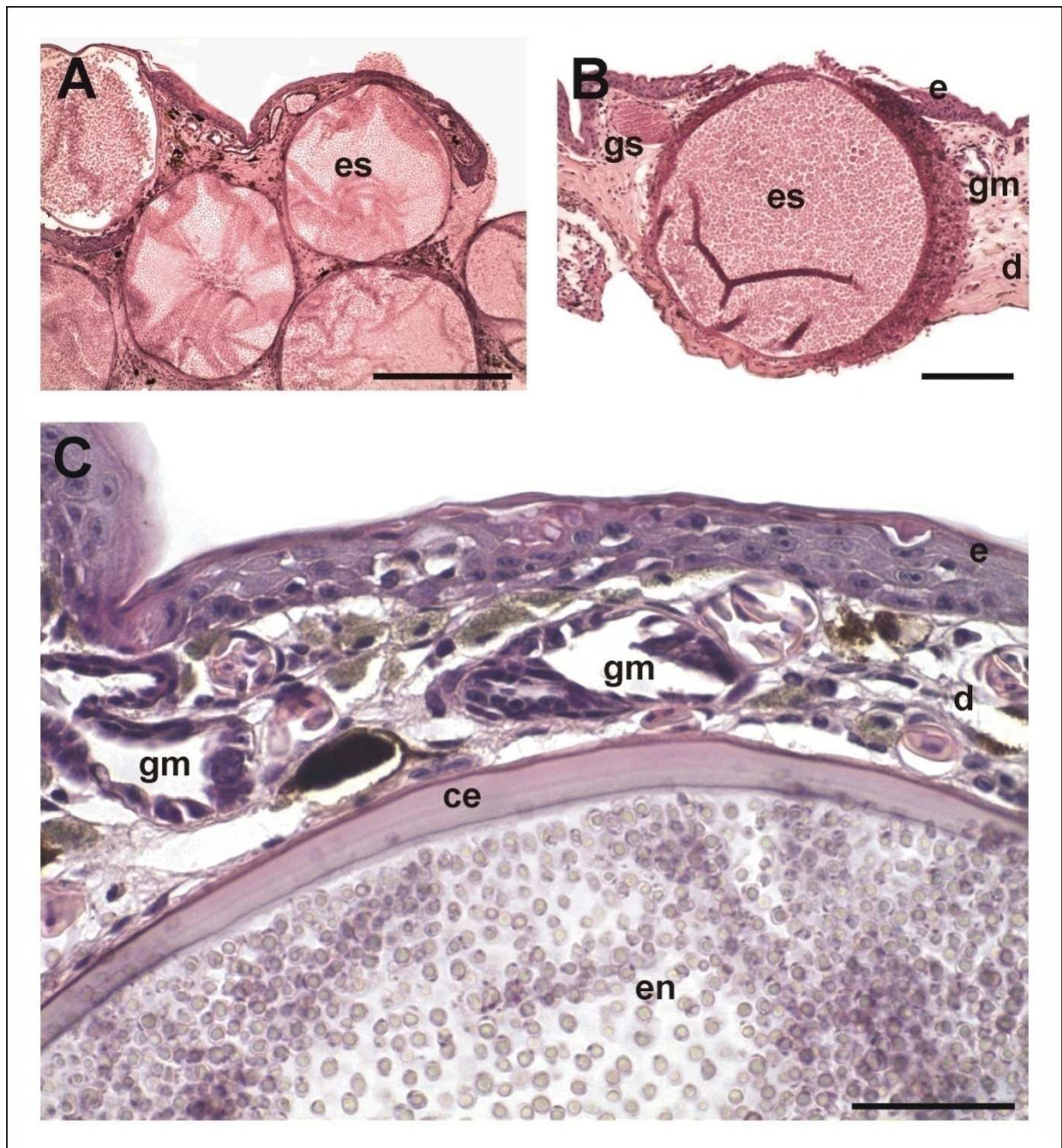
Los esporangios se diferencian de las glándulas serosas en varios aspectos. El tamaño de éstas es menor, aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de eje mayor. Su membrana basal está formada por una sola capa de células, que es marcadamente más delgada que la pared de los esporangios, figura 7.9 A. Las vesículas de secreción de las glándulas miden 2–6  $\mu\text{m}$ , siendo usualmente más chicas que las endosporas. Son además eosinófilicas con H&E, con PAS se tiñen más intensamente adquiriendo un color rosa pálido y con GRAM adquieren un color rojizo menos marcado que el de las endosporas, figura 7.9 A-C. En micrografías electrónicas las vesículas aparecen homogéneas, figura 7.9 D.

## **Lesiones en órganos internos**

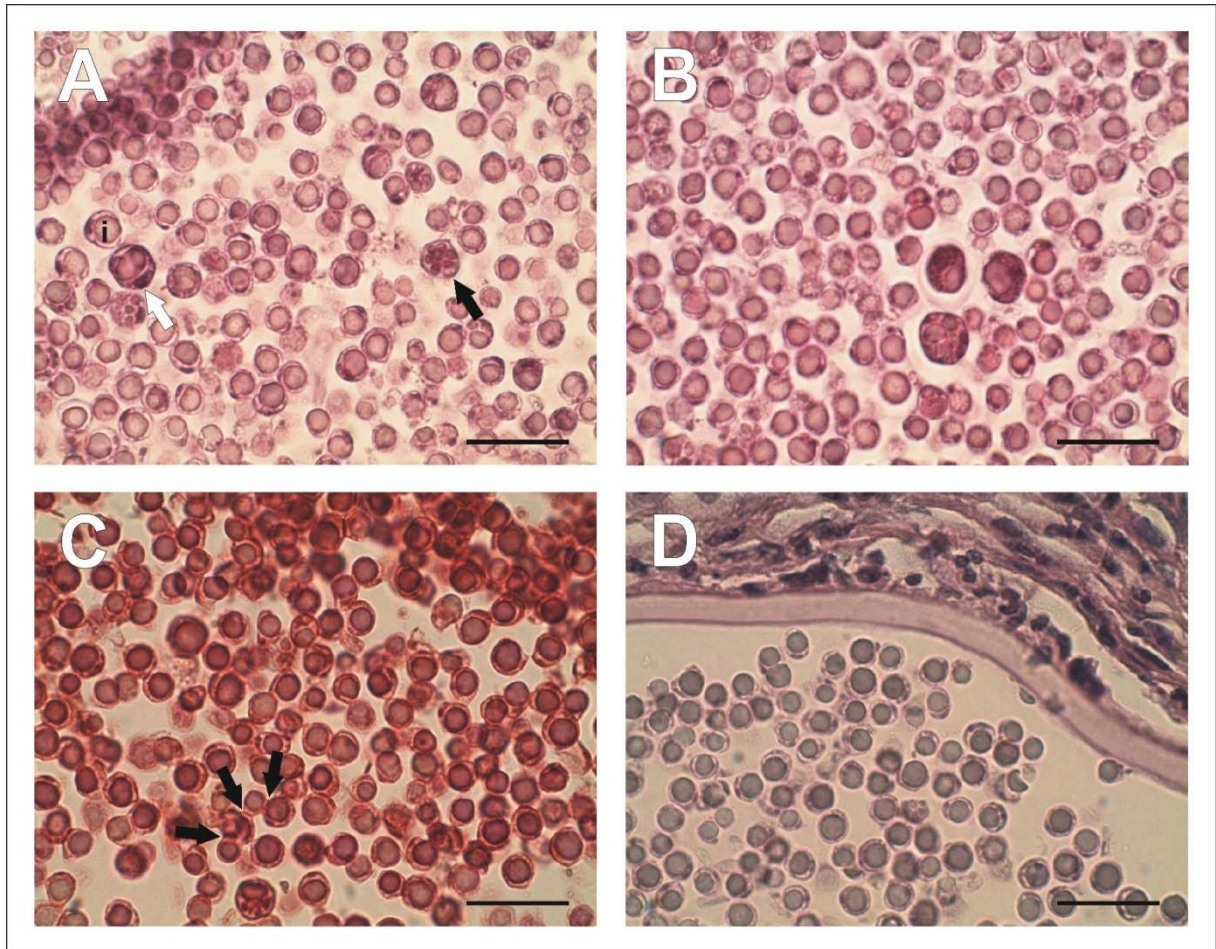
Se observaron lesiones en órganos internos en un solo individuo (MNHN 9506, macho) sobre un total de 141 ejemplares (La Paloma/Laguna de Rocha, n = 139; Valentines, n = 2). El esporangio estaba ubicado en el corazón, sobre la superficie ventral del ventrículo, y su aspecto y estructura fueron iguales a los observados en la piel de otros individuos, figura 7.10 A. A la histopatología se observó un granuloma ovoide contiguo, sobre la cara interna del pericardio, de aproximadamente 280 x 560  $\mu\text{m}$ , figura 7.10 B. Las esporas presentaron múltiples gránulos y su tamaño fue similar al de las encontradas en esporangios cutáneos (5–8  $\mu\text{m}$ ), la mayoría estaban unidas entre sí formando cadenas o mediante una sustancia de aspecto mucilaginoso (ver Capítulo 6, figura 6.5).



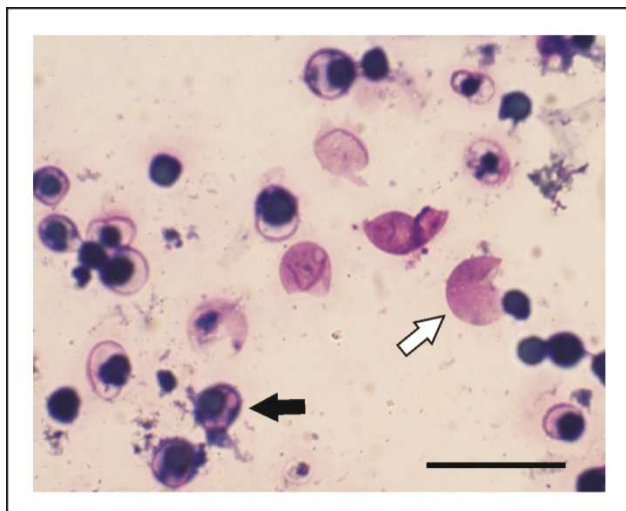
**FIGURA 7.5.** Infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*, imágenes de lesiones macroscópicas. **A**, infección en piel dorsal, MNHN 9477 (LHC 34,2 mm). **B**, infección en piel ventral, MNHN 9478 (LHC 38,2 mm). **C**, ejemplar infectado vocalizando, MNHN 9479 (23/VIII/2012), presenta nódulos en dorso y flanco (flechas). **D**, mismo ejemplar en cautiverio (25/IX/2012), los nódulos han desaparecido y la piel está cicatrizando (flechas). **E**, nódulos (flechas) en torno a la cloaca y el urostilo, BKT 3553. **F**, nódulo maduro en piel ventral, comenzando a ulcerarse, MNHN 9479. **G**, nódulo ulcerado en piel dorsal, BKT 3616. **H**, nódulo con una úlcera profunda, BKT 3616. **I**, nódulo con dos úlceras, posiblemente debidas a dos esporangios contiguos, BKT 3616. **J**, úlcera en proceso de cicatrización, la misma que se indica con flecha negra en **D**. Barras = 1 mm.



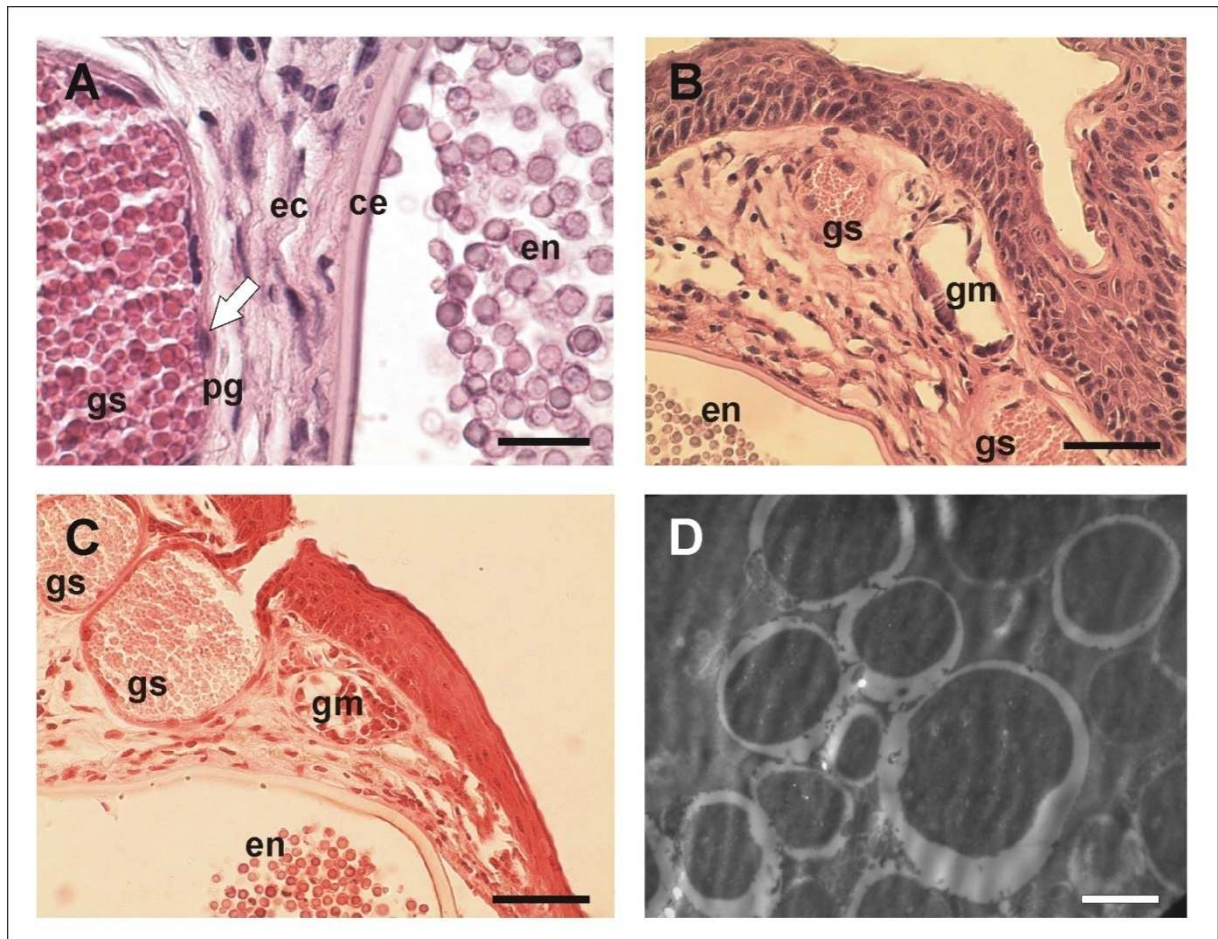
**FIGURA 7.6.** Infección por *Rhinosporidium rwanidae* en *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9477, corte histológico de un nódulo cutáneo, tinción H&E. **A**, vista parcial de un nódulo de piel dorsal pericloacal con múltiples esporangios. Barra = 500  $\mu$ m. **B**, nódulo de piel ventral con un único esporangio, se observa erosión de la epidermis contigua. Barra = 200  $\mu$ m. **C**, vista parcial de un esporangio repleto de endosporas. Barra = 50  $\mu$ m. Abreviaturas: ce, cápsula del esporangio; d, dermis; e, epidermis; en, endosporas; es, esporangio; gs, glándula serosa; gm, glándula mucosa.



**FIGURA 7.7.** Endosporas de *Rhinosporidium rwandae* en *Hysiboas pulchellus*. **A** y **B**, la mayoría tiene una gran inclusión central (i), algunas de mayor tamaño están posiblemente en proceso de división celular y se observa el núcleo excéntrico (flecha blanca), en una de ellas se aprecian al menos 6 esporoblastos (flecha negra), tinción H&E, MNHN 9477. **C**, se puede ver un conjunto de células unidas por sus paredes celulares (flechas) formando una cadeneta (mismo ejemplar), tinción GRAM. **D**, se observan endosporas y la pared del esporangio, MNHN 9478, tinción PAS. Barras = 20  $\mu$ m.



**FIGURA 7.8.** Frotis por aplastamiento de un nódulo cutáneo causado por *Rhinosporidium rwandae* en *Hysiboas pulchellus* MNHN 9477, tinción 15. Junto a células somáticas nucleadas del hospedador (flecha negra), se observan en el centro de la imagen restos de paredes celulares de microorganismos o “tecas” (flecha blanca). Barra = 20  $\mu$ m.

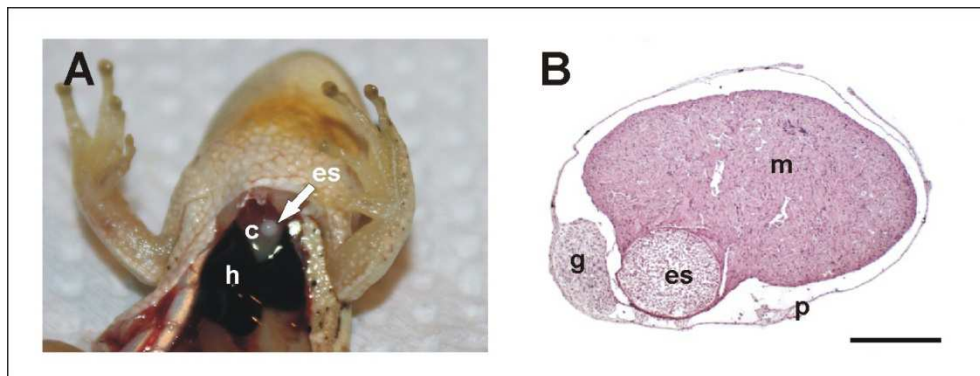


**FIGURA 7.9.** Diferenciación entre glándulas cutáneas y esporangios de *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*. **A**, corte histológico de piel ventral, MNHN 9478, tinción H&E. Barra = 20  $\mu$ m. **B**, mismo espécimen con tinción PAS. Barra = 50  $\mu$ m. **C**, tinción GRAM. Barra = 50  $\mu$ m. **D**, micrografía electrónica de transmisión del contenido de una glándula serosa, MNHN 9479, se aprecian numerosas vesículas de secreción de tamaño variable. Barra = 2  $\mu$ m. Abreviaturas: ce, cápsula del esporangio; ec, estrato compacto de dermis; en, endosporas; gm, glándula mucosa; gs, glándula serosa; pg, pared de glándula, nótese los núcleos de las células (flecha).

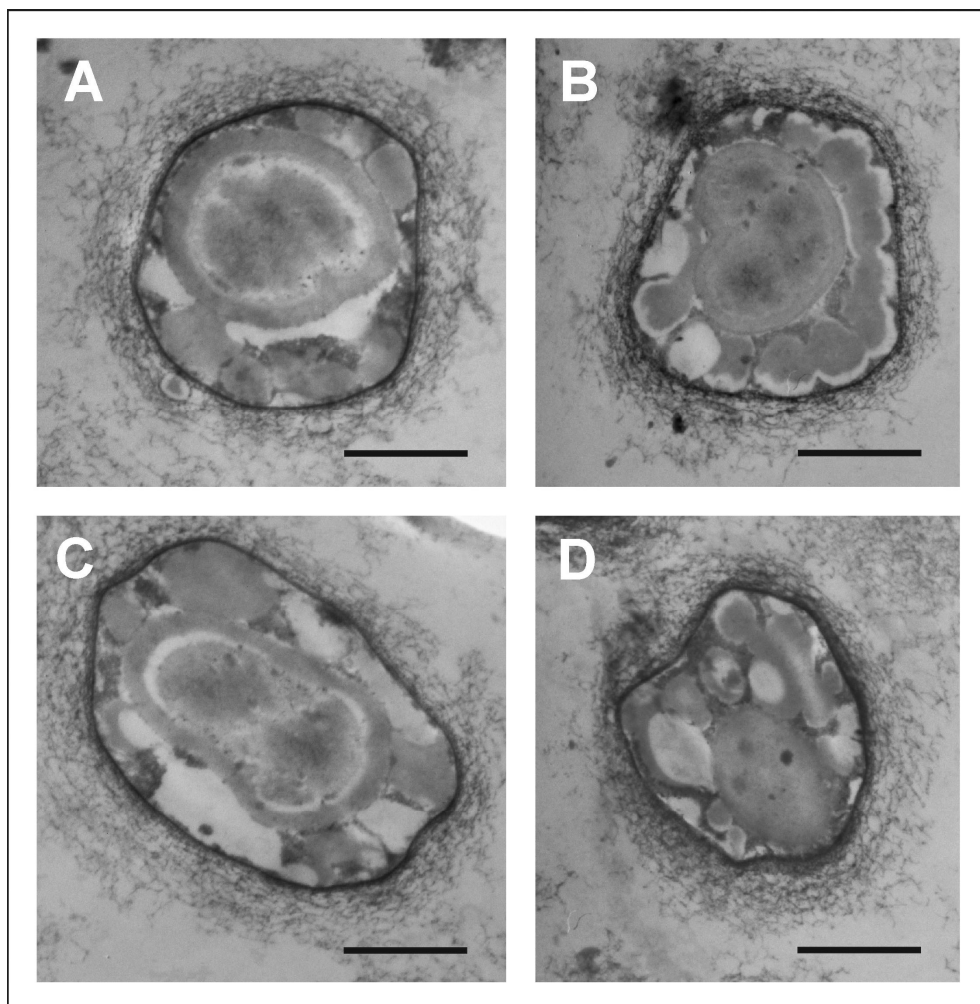
## Microscopía electrónica

Las endosporas examinadas mediante microscopía electrónica presentaron un aspecto bastante homogéneo, son en general esféricas, la pared celular no presenta anfractuosidades, y externamente tienen una zona posiblemente rica en glucoproteínas, figura 7.11. En el citoplasma hay inclusiones, usualmente una gran inclusión central que desplaza los demás componentes. Éstas tienen una zona periférica más homogénea diferenciada de la región central, que presenta zonas con electrodensidad variable. En otros casos se observan varias inclusiones satélites más pequeñas, figura 7.11 B-D.





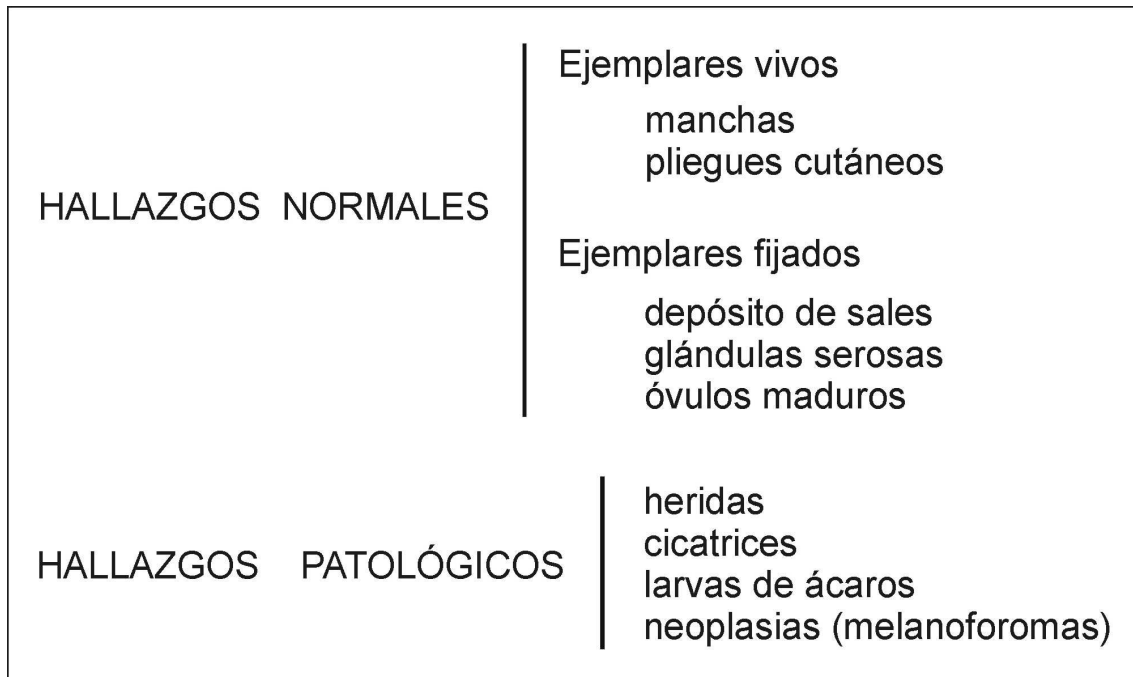
**FIGURA 7.10.** Infección cardíaca por *Rhinosporidium rwanade*, ejemplar de *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9506. **A**, vista macroscópica del esporangio (flecha). **B**, corte histológico, tinción H&E. Barra = 250  $\mu$ m. Abreviaturas: c, corazón; es, esporangio; g, granuloma; h, hígado; m, miocardio; p, pericardio.



**FIGURA 7.11.** *Rhinosporidium rwanade*, micrografías electrónicas de transmisión obtenidas de *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9477. Se observa una fina pared celular y una gran inclusión citoplasmática **A-C**, o bien múltiples inclusiones de menor tamaño, **D**. Barras = 2  $\mu$ m.

## Diagnóstico anatomopatológico y microbiológico diferencial

Diversos hallazgos macroscópicos en ejemplares de *Hypsiboas pulchellus* examinados se tuvieron en cuenta para el diagnóstico diferencial, tanto normal como patológico, ver esquema en la figura 7.12.



**FIGURA 7.12.** Esquema del diagnóstico macroscópico diferencial de infección cutánea por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus* (hallazgos en la muestra estudiada).

Los hallazgos normales más frecuentes fueron manchas blanquecinas, pliegues y protuberancias cutáneas, comúnmente presentes en ejemplares adultos de *H. pulchellus*. Manchas blanquecinas pequeñas son comunes en la piel dorsal de *H. pulchellus*, circulares, variables en número y extensión, cuando está presentes son en general escasas y no se encuentran elevadas sobre la superficie corporal, figura 7.13 A. Pequeños pliegues cutáneos alrededor de la cloaca se observaron frecuentemente, siendo muy similares en tamaño y forma a los nódulos de la infección por *Rhinosporidium*; a diferencia de las manchas y los quistes infecciosos son fácilmente depresibles y por lo tanto distinguibles a la inspección bajo lupa, figura 7.13 E.

En algunos ejemplares fijados se observaron depósitos de sales blanquecinas que a simple vista se asemejan a zonas de piel con lesiones, pero son móviles al ejercer una leve presión. La fijación durante largos períodos de tiempo puede transparentar la piel por efecto de los líquidos preservadores. Esta anomalía distorsiona el aspecto de la piel a simple vista al permitir la visualización de las glándulas cutáneas serosas y eventualmente de óvulos maduros, lo cual debe diferenciarse de hallazgos patológicos, figuras 7.13 B, G. Algunos especímenes presentaron además depósitos de sales bajo la piel, blanquecinas, de forma irregular. Con magnificación puede observarse el movimiento de los cristales al ejercer suave presión, figura 7.13 D.

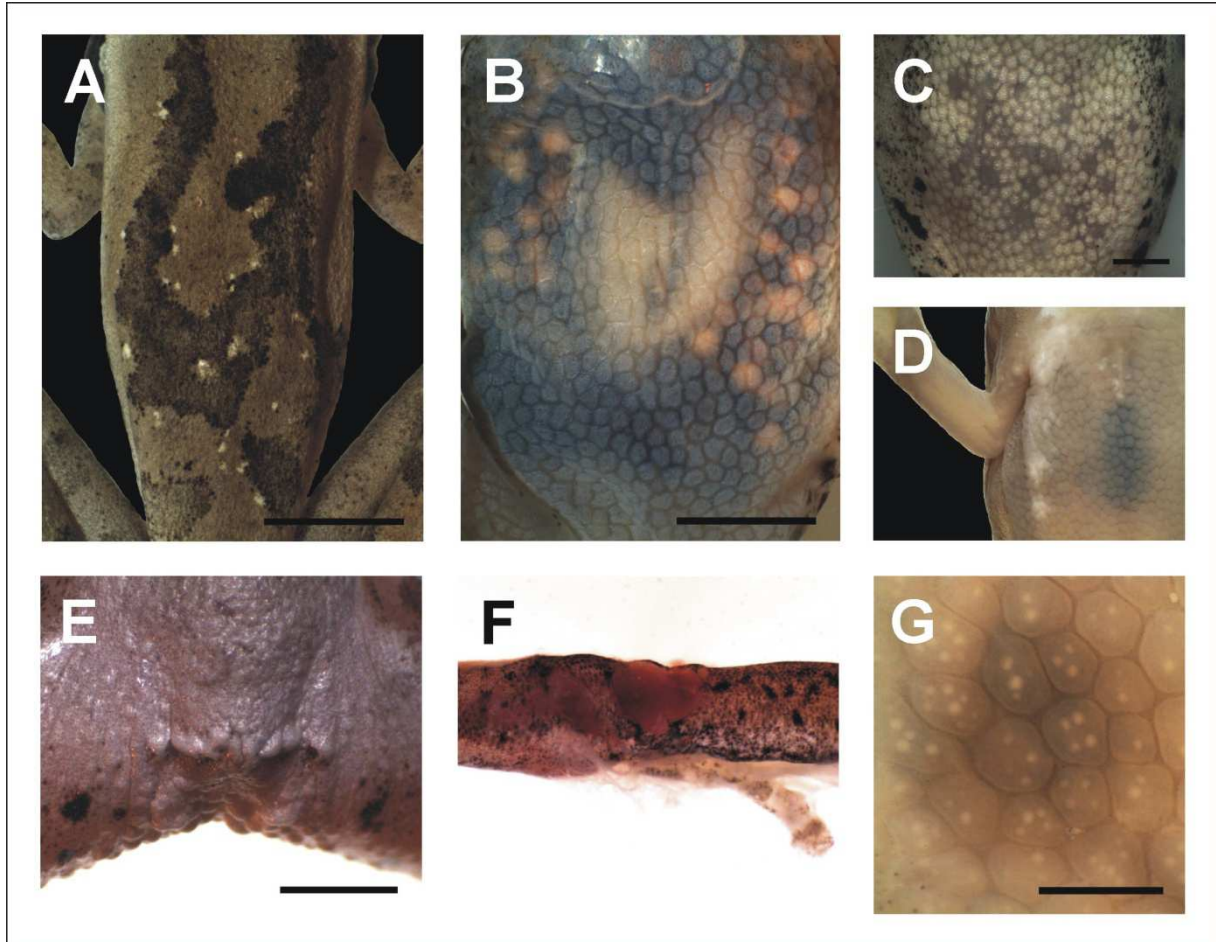
Entre los hallazgos patológicos que pueden confundirse con esporangios debidos a dermocistidios deben tenerse en cuenta heridas y cicatrices, nódulos por ácaros parásitos, otros procesos infecciosos y neoplasias. Los ejemplares de *Hypsiboas pulchellus* con infección por dermocistidios no presentaron úlceras cutáneas extensas como las reportadas en otros anfibios. Heridas y cicatrices cutáneas fueron un hallazgo relativamente frecuente, principalmente estas últimas, que no se presentan elevadas con respecto a la piel circundante y tienen un color desde blanquecino a grisáceo, figura 7.13 C, F.

Algunos ejemplares colectados en los sitios de estudio presentaron nódulos de color naranja en la piel ventral del tronco y miembros, de tamaño muy similar al de los causados por dermocistidios. Los mismos correspondieron a quistes parasitarios de larvas de ácaros pertenecientes a la familia Trombiculidae, que una vez fijados adquieren un color crema y no son fácilmente diferenciables de nódulos infecciosos. Esta parasitosis se presenta en el Capítulo 11.

Dos ejemplares de *Hypsiboas pulchellus* colectados en uno de los sitios de estudio (MNHN 9508, 9509) presentaron pequeñas zonas oscuras de la piel que al examen histológico correspondieron a melanoforomas. Estos neoplasmas son más oscuros que los nódulos por dermocistidios, su hallazgo se describe en detalle en el Capítulo 10. Neoplasias cutáneas descritas en anfibios, como los adenocarcinomas o lipomas también pueden producir nódulos, tumoraciones e incluso ulceración de la piel en el caso de los primeros (Schlumberger & Lucké 1948; Balls 1962; Green & Harshbarger 2001; Berger *et al.* 2004a).

Infecciones cutáneas no descritas en anfibios de Uruguay deben tenerse en cuenta también en el diagnóstico diferencial. Por ejemplo las micosis causadas por hongos no quitridiomycetos como la cromomicosis y zygomycosis pueden producir también una dermatopatía nodular y afectar significativamente la piel de anfibios adultos (Berger *et al.* 1997; Taylor *et al.* 1999; de Brito-Gitirana & Silva-Soares 2012). Las mismas producen una

infección difusa en los tejidos con inflamación granulomatosa, pero a diferencia de la infección por *Ichthyosporia* no hay formación de quistes con paredes bien definidas.



**FIGURA 7.13.** Diagnóstico diferencial macroscópico de infección cutánea por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*. **A**, manchas blanquecinas en piel dorsal de un ejemplar adulto. Barra = 5 mm. **B**, vista ventral de óvulos maduros en cavidad celómica, piel transparentada por efecto de líquidos fijadores, MNHN 7771. Barra = 5 mm. **C**, cicatrices en piel abdominal, BKT 3620. Barra = 2 mm. **D**, región pectoral de un ejemplar preservado en líquidos fijadores desde el año 1985, MNHN 4654. Se observan depósitos de sales blanquecinas bajo la piel. **E**, pliegues cutáneos pericloacales. Barra = 2 mm. **F**, heridas con esfacelación de piel en la cara dorsal de un miembro posterior en un ejemplar adulto, posiblemente provocadas durante la captura manual, BKT 3745. **G**, glándulas serosas en piel ventral vistas bajo lupa binocular por efecto de transparentación, MNHN 4610. Barra = 1 mm.

Diversas infecciones bacterianas también pueden afectar la piel de los anfibios presentándose como dermatopatías de tipo nodular y ulcerativo, tanto en cautiverio como en la naturaleza (Reichenbach-Klinke & Elkan 1965). Una de las más conocidas es el “red-leg”,

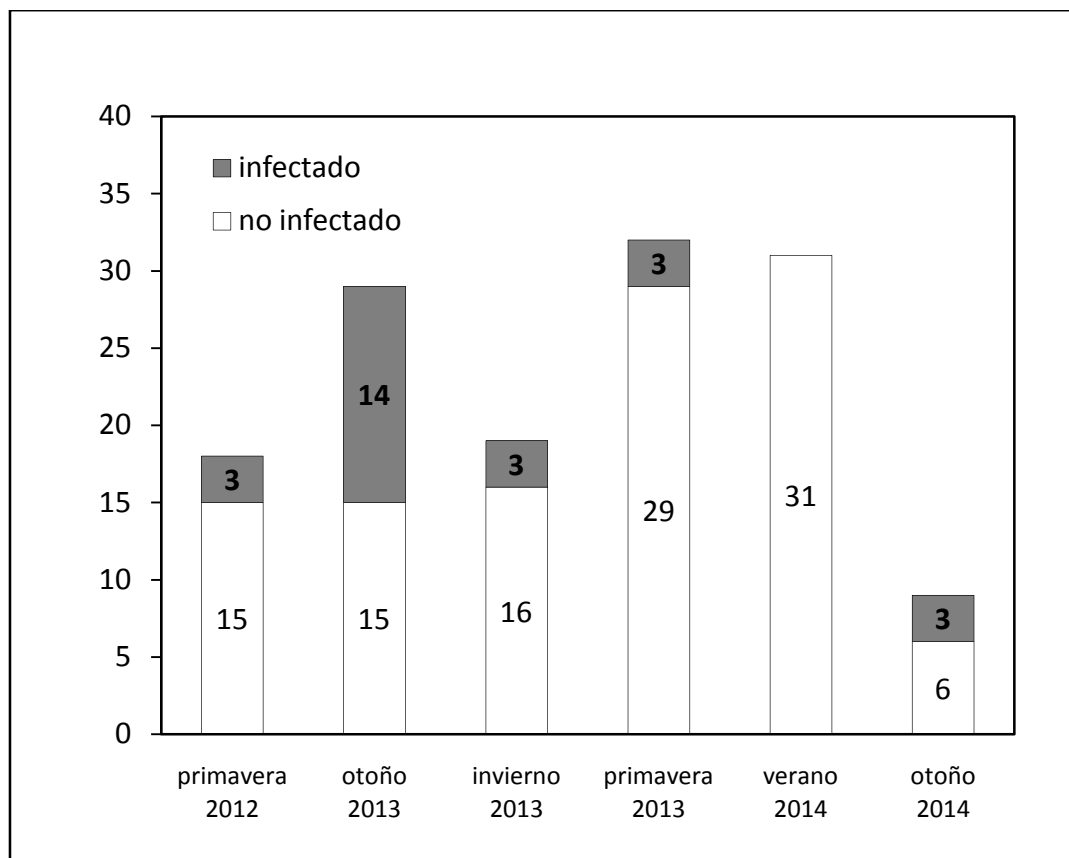
enfermedad mortal causada por diversos microorganismos, de los cuales el más conocido es *Aeromonas hydrophila*, y que produce lesiones serosas, hemorrágicas y ulcerativas con un característico enrojecimiento de la piel (Emerson & Norris 1905). La infección por micobacterias también puede presentarse como una dermatitis granulomatosa (Shively *et al.* 1981). En el caso de infecciones bacterianas el aislamiento de los microorganismos en cultivo, sumado a las lesiones características cada enfermedad permiten confirmar el diagnóstico.

Las algas unicelulares del género *Prototheca*, conocidos patógenos de mamíferos, son capaces de provocar enfermedad cutánea en peces y reptiles (Crispens & Marion 1975; Gentles & Bond 1977). Las tecas de estos microorganismos en los frotis tienen un aspecto muy similar a las observadas en este estudio, pero no forman esporangios y son GRAM y PAS positivos (Linares Sicilia & Solís Cuesta 2001; McMullan *et al.* 2011).

## Prevalencia y estacionalidad

De los 139 ejemplares adultos estudiados, 26 estaban infectados por *Rhinosporidium* (18,7 %), con una marcada variación estacional. La prevalencia fue baja en primavera, invierno y verano (0–16,7 %) y elevada en otoño (33,3–48,3 %). A comienzos de la primavera de 2012 (setiembre) se detectó un 16,7 % de ejemplares infectados (3/18). En el otoño siguiente (abril 2013) la fracción de ejemplares infectados fue la más alta observada, 48,3 % (14/29). La infección disminuyó nuevamente en el invierno (agosto) a 15,8 % (3/19), y fue más baja aún en la primavera tardía (noviembre) con un 9,4 % (3/32). En el verano posterior inmediato (febrero 2014) no se detectaron ejemplares infectados (0/31), sin embargo dos meses después ya en otoño (abril) se vuelve detectar la enfermedad en 33,3 % de los ejemplares estudiados (3/9). Los resultados crudos se muestran en la figura 7.14, y las prevalencias correspondientes se presentan en la tabla 7.1.

La frecuencia de infección en el otoño de 2013 fue significativamente más alta con respecto a todos los demás muestreos. Este aumento no fue significativo en el otoño de 2014, pero el número de ejemplares estudiado en este caso fue muy pequeño. La ausencia de infección en la muestra de febrero en el verano de 2014 (0/31) no fue significativamente diferente de la baja prevalencia observada en la primavera tardía de 2013 (noviembre, 3/29). Sin embargo lo fue con respecto a lo registrado en muestreos de otoño e invierno, las épocas más frías del año. Los resultados de las comparaciones se muestran en la tabla 7.2.



**FIGURA 7.14.** Variación estacional en la prevalencia de infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hysiboas pulchellus* de La Paloma/Laguna de Rocha, Dpto. de Rocha. En las barras se indica el número de ejemplares estudiado.

**TABLA 7.1.** Prevalencias de infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hysiboas pulchellus* en distintas épocas del año, y sus correspondientes IC 95 %.

	Positivos/n	Prevalencia	IC
Setiembre 2012	3/18	0,17	0,06–0,39
Abril 2013	14/29	0,49	0,31–0,66
Agosto 2013	3/19	0,16	0,06–0,38
Noviembre 2013	3/32	0,09	0,03–0,24
Febrero 2014	0/31	0	0–0,11
Abril 2014	3/9	0,33	0,12–0,65

**TABLA 7.2.** Comparación de las prevalencias estacionales de infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*. Se muestran valores de p para comparaciones pareadas, utilizando el test exacto de Fisher. En negrita se indica  $p < 0,05$ .

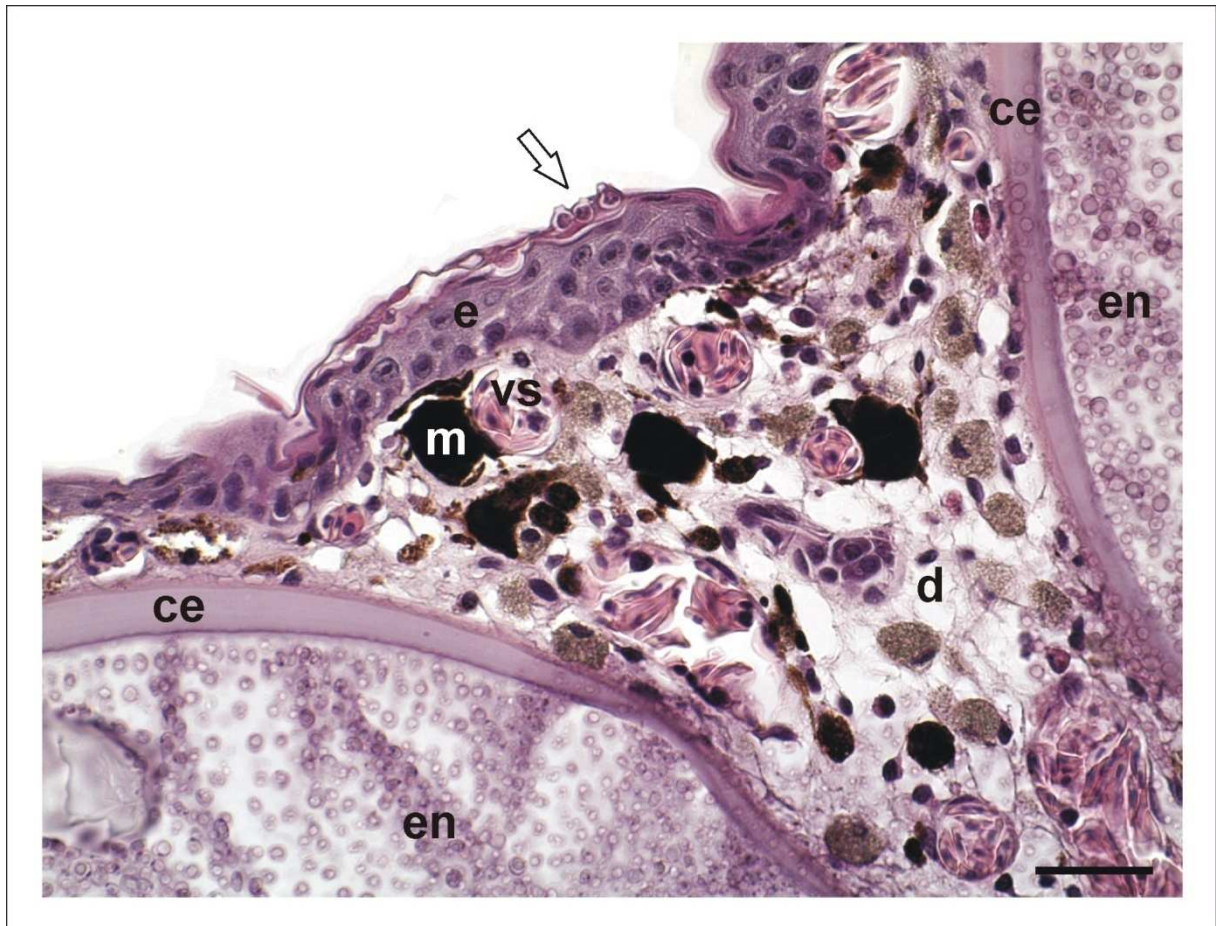
	Setiembre 2012	Abril 2013	Agosto 2013	Noviembre 2013	Febrero 2014
Abril 2013	<b>0,034</b>	-----			
Agosto 2013	1,000	<b>0,031</b>	-----		
Noviembre 2013	0,654	<b>&lt; 0,001</b>	0,659	-----	
Febrero 2014	<b>0,044</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,049</b>	0,238	-----
Abril 2014	0,367	<b>0,476</b>	0,352	0,108	<b>0,009</b>

### **Coinfección *Rhinosporidium* - *Batrachochytrium dendrobatidis***

En Valentines, Río Tacuarí, La Paloma y Laguna de Rocha se detectaron ejemplares de *Hypsiboas pulchellus* con infección activa por dermocistidios y *Batrachochytrium dendrobatidis*, tanto en piel dorsal como ventral, ver figuras 7.15 y 7.16. Sobre 137 ejemplares capturados entre setiembre de 2012 y abril de 2014 se analizó la asociación de ambas infecciones considerando como variables binomiales la presencia/ausencia de ambas mediante observación macroscópica y PCR respectivamente. La asociación no resultó significativa, coeficiente r de Spearman = 0,117 ( $p = 0,173$ ). El hallazgo de coinfección por ambos patógenos fue publicado durante el transcurso de este estudio, ver Apéndice 9.

### **Especificidad de hospedador**

En las localidades estudiadas se procuró detectar la presencia de infección por dermocistidios en otras especies de anfibios de Paloma/Laguna de Rocha y Valentines. Se estudiaron 203 ejemplares de 17 especies, incluyendo 44 ejemplares de la especie acuática *Pseudis minutus*. La mayoría de los ejemplares se colectaron en otoño, invierno y primavera ( $n = 176$ ; 87 %), épocas con mayor prevalencia de rinosporidiosis en *Hypsiboas pulchellus*, sin embargo ninguno presentó signos externos de la infección. La lista de ejemplares examinados se presenta en el Apéndice 7.



**FIGURA 7.15.** Coinfección *Rhinosporidium rwanade* - *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Hypsiboas pulchellus*, MNHN 9477, corte histológico de piel dorsal, tinción H&E. Abreviaturas: ce, cápsula del esporangio de *Rhinosporidium*; d, dermis; e, epidermis; en, endosporas de *Rhinosporidium*; m, melanóforos; vs, vaso sanguíneo. Las flechas indican esporangios de *B. dendrobatidis* con esporas y tubos de descarga. Barra = 50  $\mu$ m.

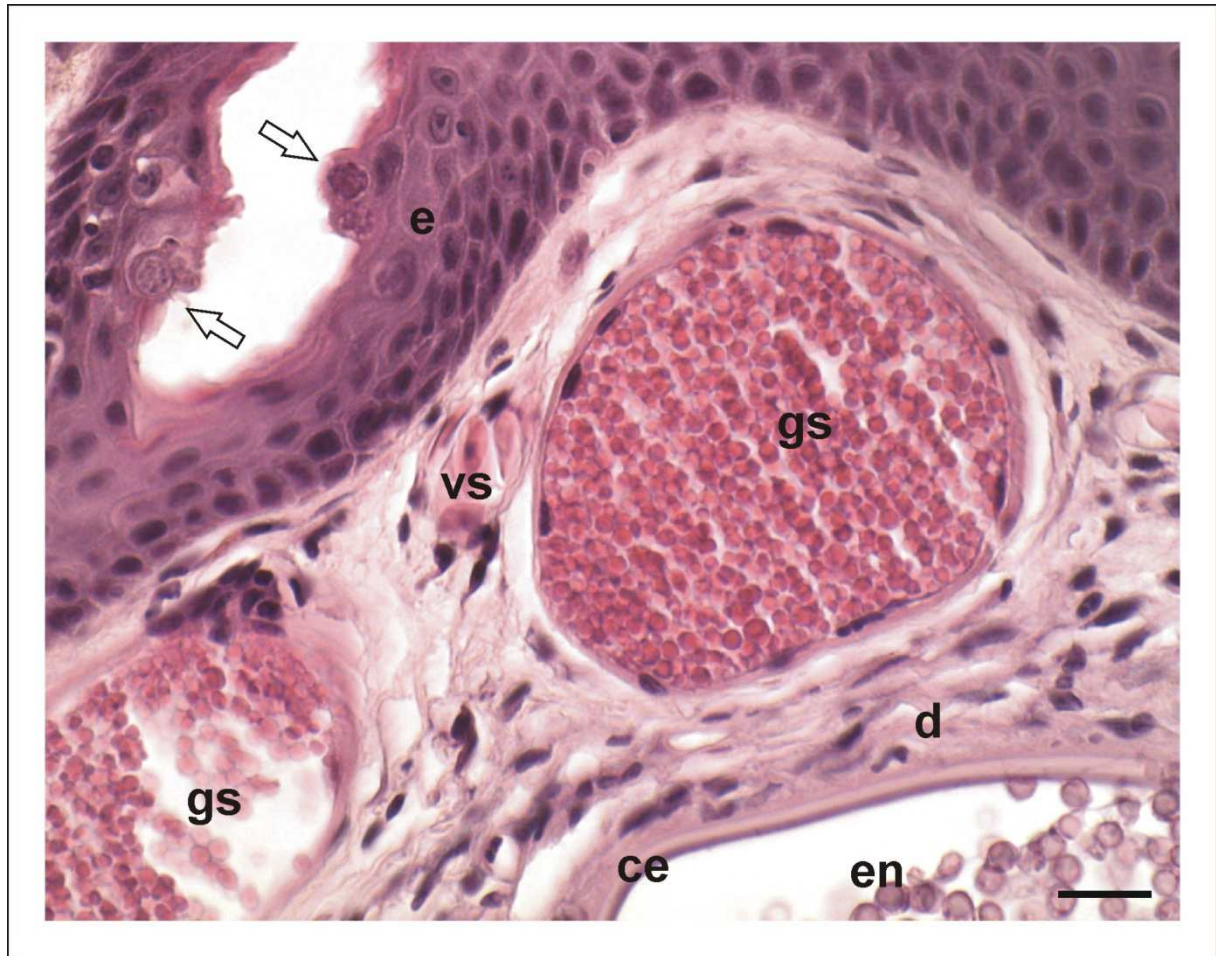
## Discusión

### Patología y microbiología

La patología de la infección por *Rhinosporidium rwanade* en *Hypsiboas pulchellus* es similar a la de la enfermedad descrita en hospedadores anfibios por otros Dermocystida. Es característica la presencia de nódulos cutáneos, que se corresponden con la presencia de esporangios en el tejido subcutáneo, delimitados por una cápsula y que contienen miles de endosporas (Jay & Pohley 1981, Pascolini *et al.* 2003, Raffel *et al.* 2008; González-Hernández *et al.* 2010). Los esporangios en anfibios son en general esféricos como en el



presente estudio o en forma de “U” (Pascolini *et al.* 2003). Los esporangios de *Rhinosporidium viridescens* pueden ser elongados, o en forma de “C”, y presentar una constricción en los extremos (Raffel *et al.* 2008). La escasa reacción inflamatoria asociada a los esporangios coincide con la mayoría de los reportes. Pérez (1913) y Granata (1919) indican que hay acúmulo de fagocitos en las zonas de ruptura de los esporangios maduros.



**FIGURA 7.16.** Coinfección *Rhinosporidium rwandae* - *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Hypsiboas pulchellus*, MNHN 9478, corte histológico de piel ventral, tinción H&E. Abreviaturas: ce, cápsula del esporangio de *Rhinosporidium*; d, dermis; e, epidermis; en, endosporas de *Rhinosporidium*; gs, glándula serosa; vs, vaso sanguíneo. Las flechas indican esporangios de *B. dendrobatidis* con esporas y tubos de descarga. Barra = 20  $\mu$ m.

En *Hypsiboas pulchellus* la distribución asimétrica de las lesiones en regiones de piel ventrales y urostilo es similar a lo observado en anfibios del género *Hyperolius* en África (Scheid *et al.* 2015) y en *R. viridescens* (Raffel *et al.* 2008). El patrón de distribución ventral y

en la región pericloacal sugiere que el contacto con las formas infectantes se daría principalmente en zonas ventrales del cuerpo. En el caso de *H. pulchellus* puede observarse el contacto frecuente de la piel ventral con cuerpos de agua cuando los machos vocalizan sobre vegetación flotante o semisumergida. El contacto con cuerpos de agua parece ser indispensable para adquirir infección por *R. seeberi* (Arseculeratne & Mendoza 2005; Kaluarachchi *et al.* 2008). No está claro si el ingreso de formas infectantes de ésta y otras especies de dermocistidios al hospedador necesita de lesiones previas, por ejemplo como las causadas por *Batrachochytrium dendrobatidis*. En el caso de los tritones de la especie *Notophthalmus viridescens*, se ha sugerido que parasitosis por sanguijuelas podría vehicular la infección por *Ichthyophonus* sp. (Raffel *et al.* 2006).

La gran mayoría de los dermocistidios parásitos de anfibios han sido descritos como patógenos de la piel (Pascolini *et al.* 2003; González-Hernández *et al.* 2010). La presencia de esporangios en órganos internos ha sido reportada para *Rhinosporidium viridescens*, que produce lesiones en el hígado con baja frecuencia y no necesariamente asociadas a lesiones cutáneas (Raffel *et al.* 2008). Al igual que en nuestro caso los esporangios en órganos internos fueron de similares características a los de la piel. Las lesiones en órganos internos por *R. seeberi* así como la rinosporidiosis generalizada en humanos son raras (Arseculeratne & Mendoza 2005). Por el contrario, la afección en órganos internos como el corazón, hígado y bazo es frecuente y puede ser severa en el caso de infecciones por *Ichthyophonus* en peces (Marty *et al.* 1998; Kocan *et al.* 1999; Kocan & Hershberger 2006).

El tamaño y la morfología de los microorganismos observados en *Hypsiboas pulchellus* son coincidentes con los reportados para dermocistidios hallados en otras especies de anfibios. Las esporas de las distintas especies descritas miden en general entre 6 y 12  $\mu\text{m}$ , y el citoplasma es usualmente “crescent-shaped” con una gran inclusión que desplaza los demás componentes hacia la periferia de la célula, o bien se observan varias inclusiones más pequeñas (Pérez 1907; 1913; Moral 1913; Granata 1919; Guyénot & Naville 1922; Poisson 1937; Carini 1940; Brož & Přívora 1952; Jay & Pohley 1981; Pascolini *et al.* 2003; Raffel *et al.* 2008; Scheid *et al.* 2015). La presencia de mitocondrias con crestas planas ha sido indicada como característica de *Ichthyospora* (Rowley *et al.* 2013), pero en el presente estudio no fue posible observar la morfología de las mitocondrias. Esto quizá se debió a un artefacto de fijación ya que las muestras utilizadas no fueron originalmente fijadas para realizar técnicas de microscopía electrónica.

El aspecto de las tecas en los frotis por aplastamiento es igual al de otros microorganismos no cercanamente emparentados. Estas estructuras aparecen en numerosos

grupos de protistas (ver Cavalier-Smith 2013), y en dermocistidios no parecen presentar características distintivas al estudio de microscopía óptica con tinciones convencionales.

Las uniones intercelulares observadas en el esporangio presente en el corazón de un ejemplar de *Hypsiboas pulchellus* posiblemente correspondan a alguna fase del desarrollo y maduración de las esporas. Uniones entre endosporas mediante finos filamentos fueron observadas únicamente por Guyénot & Naville (1922) y Scheid *et al.* (2015).

Los intentos infructuosos de cultivo como en el presente estudio han sido repetidamente publicados para Dermocystida, incluidos algunos trabajos a partir de hospedadores anfibios (Pérez 1907; Moral 1913; Brož 1944). Escasos avances se han obtenido con *Rhinosporidium seeberi* en cultivos celulares, sin que se haya podido lograr su persistencia en condiciones de laboratorio (Levy *et al.* 1986; Arseculeratne & Mendoza 2005; Vilela & Mendoza 2012).

## Virulencia y especificidad de hospedador

La dermocistidiosis es potencialmente letal en anfibios adultos pero los reportes de enfermedad severa y mortalidad natural son escasos (Moral 1913; Raffel *et al.* 2008). Raffel *et al.* (2008) observa que infecciones severas por *Rhinosporidium viridescens* en invierno se asociaron a infecciones bacterianas secundarias podrían llegar a ser una causa importante de mortalidad. En salmónidos de Norteamérica sí se han observado altas tasas de mortalidad atribuidas a *Dermocystidium* sp. (Olson *et al.* 1991) y *Sphaerothecum destruens* (Harrell *et al.* 1986).

En los sitios de estudio no se observaron episodios de mortalidad en *Hypsiboas pulchellus* asociada a infección por *Rhinosporidium rwandae*. En los mismos este anfibio es una especie común y muy abundante. Por otra parte, en algunos ejemplares de *H. pulchellus* mantenidos en condiciones usuales de laboratorio la infección cutánea fue autolimitante, con remisión total de las lesiones pocos días. Esto coincide con observaciones de varios trabajos sobre infección en anfibios, en los que los individuos curan en un corto tiempo sin verse en apariencia afectados negativamente por la infección (Pérez 1907; 1913; Carini 1940; Brož 1944; Jay & Pohley 1981; Raffel *et al.* 2008).

La infección por *Rhinosporidium* solamente se detectó en *Hypsiboas pulchellus*, pero su ocurrencia en otras especies de anfibios no puede descartarse. Resulta interesante el hecho de que ninguno de los ejemplares de la especie acuática *Pseudis minutus* colectados en otoño,

invierno o primavera (n = 44), presentara la infección. Si bien debería estudiarse una muestra mayor, esto puede deberse a la especificidad de hospedador del patógeno.

Algunas especies de dermocistidios al parecer podrían infectar más de un hospedador anfibio, como es el caso de *Amphibiothecum penneri* (Jay & Pohley 1981; Green *et al.* 2002), *R. ranae* (Guyénot & Naville 1922; Remy 1931; Brož 1944; Brož & Kulda 1954; Pascolini *et al.* 2003) y *Dermocystidium pusula* (Pérez 1907; Moral 1913; Pérez 1913; De Beauchamp 1914). *Rhinosporidium seeberi* es capaz de infectar diversas especies de hospedadores homeotermos como aves (*Cygnus* sp.), humanos, caninos y equinos (Silva *et al.* 2005; Vilela & Mendoza 2012), y *Sphaerothecum destruens* puede afectar diversas especies de peces (Gozlan *et al.* 2005; Gozlan *et al.* 2009). Scheid *et al.* (2015) sugieren cierta especificidad de hospedador para las infecciones por *Rhinosporidium rwandae* en anfibios del género *Hyperolius*. De todas formas en anfibios faltan estudios moleculares confirmatorios del rango de hospedador.

La transmisión directa entre hospedadores de una misma especie o especies diferentes no se ha logrado en anfibios ya sea por administración del contenido de esporangios vía oral, mediante inyección, escarificación o contacto con ejemplares infectados (Moral 1913; Carini 1940; Jay & Pohley 1981). Únicamente Poisson (1937) reporta el contagio de tritones de la especie *Triturus palmatus* aparentemente sanos, que fueron puestos en un acuario junto con individuos infectados. En peces se han realizado infecciones experimentales exitosas en el caso de *Dermocystidium salmonis* (Olson *et al.* 1991).

## **Prevalencia y estacionalidad**

Las prevalencias reportadas en la literatura para infecciones por dermocistidios en anfibios son muy variables, desde 4 a 52 % pero en general las observaciones son puntuales o parciales a lo largo del año (Guyénot & Naville 1922; Carini 1940; Brož 1944; Brož & Přívora 1952; Jay & Pohley 1981; Pascolini *et al.* 2003; Curtois *et al.* 2013). En el caso de *Rhinosporidium viridescens* las prevalencias detectadas a lo largo del año por Raffel *et al.* (2008) variaron desde 0,1 a 75 %, en un hospedador que no se encuentra en declinación. En forma similar las prevalencias observadas en *Hypsiboas pulchellus*, variaron entre 0 y 48,3 % a lo largo del año. Posiblemente en ambos casos de estudio los parásitos se encontraban en equilibrio con sus hospedadores.

Al igual que en *Hypsiboas pulchellus*, la mayoría de los reportes en anfibios sugiere que la infección por Dermocystida presenta un carácter estacional. En Europa Pérez (1907; 1913) encuentra un pico de infección en invierno (febrero y marzo) durante un período de tres años, similar a las observaciones de Poisson (1937), con un pico en invierno y primavera (marzo y abril) en dos años de observaciones. Otros reportes de infección en anfibios europeos también coinciden principalmente con invierno y primavera (Guyénot & Naville 1922; Remy 1931; Brož & Přívora 1952; Curtois *et al.* 2013). En EEUU *Amphibiothecum penneri* se encontró en otoño y primavera (Jay & Pohley 1981), el pico de infección por *Rhinosporidium viridescens* en *Notophthalmus viridescens* ocurre en invierno y primavera temprana (Raffel *et al.* 2008).

En peces y anfibios el comportamiento estacional de enfermedades fúngicas y por dermocistidios en épocas frías puede deberse a una respuesta inmune disminuida del hospedador asociada al crecimiento óptimo de patógenos a bajas temperaturas (Bly *et al.* 1993; Berger *et al.* 2004; Raffel *et al.* 2008). La variación de factores ambientales como el pH podría también influir significativamente en las tasas de infección (Carlin 2014). Esto último podría ser particularmente importante en el caso de formas infectantes presentes en ambientes acuáticos como charcas estacionales o semipermanentes, sujetos a grandes variaciones periódicas.

### **Coinfección *Rhinosporidium* - *Batrachochytrium dendrobatidis***

Desde el descubrimiento del hongo quitridiomiceto *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) en 1998 (Berger *et al.* 1998), la infección conjunta con otros microorganismos eucariotas patógenos de la piel no había sido documentada hasta el presente estudio. Green y Kagarise Sherman (2001) identificaron infección por *Bd* y *Amphibiothecum penneri* en especímenes del sapo bufónido *Anaxyrus canorus* colectados en el mismo sitio, pero no observaron coinfección en los mismos hospedadores. Groner y Relyea (2010) reportan que una población del tritón *Notophthalmus viridescens* detectaron ejemplares infectados tanto con *Bd* como *Rhinosporidium viridescens*, pero no indican si ambos patógenos fueron encontrados simultáneamente.

Cabe destacar que lo que parece ser el primer reporte de coinfección por dermocistidios-quitridios es el trabajo de De Beauchamp (1914) en *Lissotriton helveticus*. Este autor describe una enfermedad nodular de la piel causada por *Dermocystidium pusula* y encuentra además organismos unicelulares de 8 x 3 µm incluidos en pequeños esporangios de 13 x 10 µm de

fina pared. Observó que estos esporangios producían esporas esféricas o ligeramente piriformes de unas 2,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un flagelo de aproximadamente diez veces esta longitud. De Beauchamp (1914) identificó a estos microorganismos como hongos quitridiomycetos. Observaciones similares fueron hechas por Grassé (1926) y Poisson (1937) en *L. helveticus*; este último observó esporangios pequeños con esporoblastos diminutos de 1–1,5  $\mu\text{m}$ , que producían esporas de 2,5–3  $\mu\text{m}$  y con un flagelo relativamente largo. La morfología de estos pequeños esporangios y esporas flageladas observadas por De Beauchamp (1914) y Poisson (1937) coinciden con el tamaño de las producidas por *Bd* (Longcore *et al.* 1999; Berger *et al.* 2000; Berger *et al.* 2005). De Beauchamp (1914) no descartó la posibilidad de que las esporas flageladas fuesen producidas por los dermocistidios, lo cual es sugerido por Poisson (1937). Ningún otro autor menciona la producción tanto de pequeños esporangios aislados como de esporas flageladas por dermocistidios u otros parásitos similares presentes en la piel de anfibios (Pascolini *et al.* 2003; Raffel *et al.* 2008). En este sentido, Pascolini *et al.* (2003) sugieren que las observaciones de Poisson (1937) corresponden al primer reporte de quitridiomycosis de anfibios. Sin embargo, el trabajo de De Beauchamp (1914) con observaciones similares pasó inadvertido en la literatura reciente, siendo citado solamente por trabajos viejos (Guyénot & Naville 1922; Grassé 1926; Poisson 1937). La fecha más temprana de detección de quitridiomycosis en Europa usualmente señalada en la literatura es 1997 (Bosch *et al.* 2001). La posible presencia de quitridios en anfibios de Europa continental de principios del siglo XX sugerida por el trabajo de De Beauchamp (1914), es previa a la introducción de ranas del género *Xenopus* desde África, los primeros vectores potenciales de quitridios en gran escala. *Xenopus laevis* (Daudin) fue introducida en Gran Bretaña hacia finales del siglo XIX (1896), pero recién comenzó a ser común como animal de laboratorio en Europa a partir de los años 1930s (Gurdon & Hopwood 2000). En forma similar, *Bd* se encontró en anfibios de Japón colectados en 1902, previo al establecimiento de un intenso y epidemiológicamente relevante comercio internacional de ranas *Xenopus* (Goka *et al.* 2009).

La mayor prevalencia de dermocistidios y quitridios en *Hypsiboas pulchellus* en épocas frías del año (otoño e invierno), podría explicarse por el patrón de actividad del hospedador y el desarrollo óptimo del patógeno a bajas temperaturas. Sin detrimento de ello, la asociación de dermocistidios a la presencia de quitridios permite plantear la hipótesis de una posible interacción entre ambos patógenos con un efecto potenciador. Es posible que el daño que causa *Bd* en la piel de anfibios susceptibles pudiese facilitar la infección por dermocistidios o viceversa.

## Referencias

- Abramoff, M.D., Magalhães, P.J. & Ram, S.J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), 36–42.
- Arseculeratne, S.N. & Mendoza, L. (2005) *Rhinosporidium seeberi*. Chapter 26. En: *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10<sup>ma</sup> ed., John Wiley & Sons.
- Ashworth, J.H. (1924) XVI.—On *Rhinosporidium seeberi* (Wernicke, 1903), with special reference to its sporulation and affinities. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 53(2), 301–342.
- Balls, M. (1962) Spontaneous neoplasms in Amphibia: a review and descriptions of six new cases. *Cancer Research*, 22, 1142–1154.
- Berger, L. Speare, R. & Humphrey, J. (1997) Mucormycosis in a free ranging tree frog from Australia. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(4), 903–907.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocombe, R., Ragan, M.A., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Hines, H.B., Lips, K. R., Marantelli, G., & Parkes, H. (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 95(15), 9031–9036.
- Berger, L., Speare, R. & Kent, A. (2000) Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. *Zoos Print Journal*, 15(1), 184–190.
- Berger, L., Speare, R., Hines, H.B., Marantelli, G., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Skerratt, L.F., Olsen, V., Clarke, J.M., Gillespie, G., Mahony, M., Sheppard, N., Williams, C. & Tyler, M.J. (2004) Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal*, 82(7), 434–439.
- Berger, L., Speare, R. & Middleton, D. (2004a) A squamous cell carcinoma and an adenocarcinoma in Australian treefrogs. *Australian Veterinary Journal*, 82(1–2), 96–98.
- Berger, L., Hyatt, A.D., Speare, R. & Longcore, J.E. (2005) Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68(1), 51–63.
- Bly, J.E., Lawson, L.A., Szalai, A.J. & Clem, L.W. (1993) Environmental factors affecting outbreaks of winter saprolegniosis in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, 16(6), 541–549.
- Borteiro, C., Aramburu, A., Kolenc, F. & Cruz, J.C. (2009) Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84(2), 159–162.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I. & García-París, M. (2001) Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation*, 97(3), 331–337.
- Brož, O. (1944) Die Herkunft der Zystenmembran von *Dermocystidium ranae*. *Vestník Československe Spolecnosti Zoologicke*, 9, 16–25.
- Brož, O. & Kulda, J. (1954) *Dermosporidium multigranulare* n. sp parasit z kuže *Rana esculenta*. *Věstník Československé Zoologické Spolecnosti*, 18, 91–97.
- Brož, O. & Přívora, M. (1952) Two skin parasites of *Rana temporaria*: *Dermocystidium ranae* Guyénot & Naville and *Dermosporidium granulosum* n. sp. *Parasitology*, 42, 65–69.
- Carini, A. (1940) Sobre um parasito semelhante a um “*Rhinosporidium*”, encontrado em quistos da pele de uma “*Hyla*”. *Arquivos do Instituto*

- Biológico (São Paulo)*, 11, 93–98.
- Carlin, K. (2014) Infections and pH. *Journal of Applied Medical Sciences*, 3(3), 1–3.
- Cavalier-Smith, T. (2013) Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Loukozoa, Sulcozoa, and Choanozoa. *European Journal of Protistology*, 49(2), 115–178.
- Crispens, C.G. & Marion, K.R. (1975) Algal infection in a Corn snake (*Elaphe guttata guttata*). *Laboratory Animal Science*, 25(6), 788–789.
- Curtois, E.A., Cornuau, J.H., Loyau, A. & Schmeller, D.S. (2013) Distribution of *Amphibiocystidium* sp. in palmate newts (*Lissotriton helveticus*) in Ariège, France. *Herpetology Notes*, 6, 539–543.
- De Beauchamp, M.P. de (1914) L'évolution et les affinités des Protistes du genre *Dermocystidium*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences (Paris)*, 158, 1359–1360.
- de Brito-Gitirana, L. & Silva-Soares, T. (2012) Chromomycosis in *Rhinella icterica*. *The Open Zoology Journal*, 5(1), 38–41.
- de Mello, M.T. (1943) Rhinosporidiosis. *Mycopathologia*, 4(1), 342–348.
- Emerson, H. & Norris, C. (1905) “Red-leg”, an infectious disease of frogs. *Journal of Experimental Medicine*, 7(1), 32–58.
- Gentles, J.C. & Bond, P.M. (1977) Protothecosis of Atlantic salmon. *Sabouraudia*, 15(2), 133–139.
- Glockling, S.L., Marshall, W.L. & Gleason, F.H. (2013) Phylogenetic interpretations and ecological potentials of the Mesomycetozoea (Ichthyosporea). *Fungal Ecology*, 6, 237–247.
- Goka, K., Yokoyama, J., Une, Y., Kuroki, T., Susuki, K., Nakahara, M., Kobayashi, A., Inaba, S., Mizutani, T. & Hyatt, A. (2009) Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, 18(23), 4757–4774.
- González-Hernández, M., Denoël, M., Duffus, A.J.L., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A. & Acevedo-Whitehouse, K. (2010) Dermocystid infection and associated skin lesions in free-living palmate newts (*Lissotriton helveticus*) from Southern France. *Parasitology International*, 59(3), 344–350.
- Gozlan, E.R., Saint-Hilaire, S., Feist, S.W., Martin, P. & Kent, M.L. (2005) Biodiversity: disease threat to European fish. *Nature*, 435(7045), 1046.
- Gozlan, E.R., Whipps, C.M., Andreou, D. & Arkush, K.D. (2009) Identification of a rosette-like agent as *Sphaerothecum destruens*, a multi-host fish pathogen. *International Journal of Parasitology*, 39(10), 1055–1058.
- Granata, L. (1919) *Dermomycoïdes beccarii* n.g n.sp nuovo enigmatico parassita di *Molge vulgaris* L. *Monitore Zoologico Italiano*, 30, 153–160.
- Grassé, P. (1926) Contribution à l'étude des flagellés parasites. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 65, 345–602.
- Green, D.E. & Harshbarger, J.C. (2001) Chapter 26. Spontaneous neoplasia in Amphibia. En: Wright, K.M. & Whitaker, B.R. (eds.) *Amphibian medicine and captive husbandry*, Krieger Publishing Co., Malabar, Florida, pp. 335–400.
- Green, D.E. & Kagarise Sherman, C. (2001) Diagnostic histological findings in Yosemite Toads (*Bufo canorus*) from a die-off in the 1970s. *Journal of Herpetology*, 35(1), 92–103.
- Green, D.E., Converse, K.A. & Schrader, A.K. (2002) Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the U.S.A., 1996–2001. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969, 323–339.
- Groner, M.L. & Relyea, R.A. (2010) *Batrachochytrium dendrobatidis* is present in northwest Pennsylvania, USA, with high prevalence in *Notophthalmus viridescens*.



- Herpetological Review*, 41(4), 462–465.
- Gurdon, J.B. & Hopwood, N. (2000) The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology*, 44(1), 43–50.
- Guyénot, E. & Naville, A. (1922) Un nouveau protiste du genre *Dermocystidium* parasite de la Grenouille *Dermocystidium ranae* nov. spec. *Revue Suisse de Zoologie*, 29, 133–145.
- Harrell, L.W., Elston, R.A., Scott, T.M. & Wilkinson, M.T. (1986) A significant new systemic disease of net-pen reared Chinook salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) brood stock. *Aquaculture*, 55(4), 249–262.
- Jay, J.M. & Pohley, J.W. (1981) *Dermosporidium penneri* sp. n. from the skin of the American Toad, *Bufo americanus* (Amphibia: Bufonidae). *Journal of Parasitology*, 67(1), 108–110.
- Kaluarachchi, K., Sumathipala, s., Eriyagama, N., Atapattu, D. & Arseculeratne, S. (2008) The identification of the natural habitat of *Rhinosporidium seeberi* with *R. seeberi*-specific in situ hybridization probes. *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*, 25, 25–32.
- Karunaratne, W.A. (1936) The pathology of *Rhinosporidiosis*. *Journal of Pathology*, 42(1), 193–202.
- Kocan, R. & Hershberger, P. (2006) Differences in *Ichthyophonus* prevalence and infection severity between upper Yukon River and Tanana River chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), stocks. *Journal of Fish Diseases*, 29(8), 497–503.
- Kocan, R.M., Hershberger, P., Mehl, T., Elder, N., Bradley, M. Wildermuth, D. & Stick, K. (1999) Pathogenicity of *Ichthyophonus hoferi* for laboratory-reared Pacific herring *Clupea pallasii* and its early appearance in wild Puget Sound herring. *Diseases of Aquatic Organisms*, 35(1), 23–29.
- Levy, M.G., Meuten, D.J. & Breitschwerdt, E.B. (1986) Cultivation of *Rhinosporidium seeberi* in vitro: interaction with epithelial cells. *Science*, 234(4775), 474–476.
- Linares Sicilia, M.J. & Solís Cuesta, F. (2001) Capítulo 11. Identificación de levaduras. En: Pemán, J., Martín-Mazuelos, E. & Rubio Calvo, M.C. (eds.), *Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Revista Iberoamericana de Micología*, pp. 1–18.
- Longcore, J.E., Pessier, A.P. & Nichols, D.K. (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov. a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91(2), 219–227.
- Marty, G.D., Freiberg, E.F., Meyers, T.R., Wilcock, J., Farver, T.B., Hinton, D.E. (1998) Viral hemorrhagic septicemia virus, *Ichthyophonus hoferi*, and other causes of morbidity in Pacific herring *Clupea pallasii* spawning in Prince William Sound, Alaska, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32(1), 15–40.
- McMullan, B., Muthiah, K., Stark, D., Lee, L. & Marriott, D. (2011) *Prototheca wickerhamii* mimicking yeast: a cautionary tale. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), 3078–3081.
- Mendoza, L., Taylor, J.W. & Ajello, L. (2002) The Class Mesomycetozoa: a heterogeneous group of microorganisms at the Animal-Fungal boundary. *Annual Review of Microbiology*, 56, 315–344.
- Moral, H. (1913) Über das Auftreten von *Dermocystidium pusula* (Pérez), einem einzelligen Parasiten der Haut des Molches bei *Triton cristatus*. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 81, 381–393.
- Olson, R.E., Dungan, C.F. & Holt, R.A. (1991) Water borne transmission of *Dermocystidium salmonis*

- in the laboratory. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12(1), 41–48.
- Pascolini, R., Daszak, P., Cunningham, A.A., Tei, S., Vagnetti, D., Bucci, S., Fagotti, A. & Di Rosa, I. (2003) Parasitism by *Dermocystidium ranae* in a population of *Rana esculenta* complex in Central Italy and description of *Amphibiocystidium n. gen.* *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(1), 65–74.
- Pérez, C. (1907) *Dermocystis pusula* organisme nouveau parasite de la peau des tritons. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales (Paris)*, 63, 445–446.
- Pérez, C. (1913) *Dermocystidium pusula*. Parasite de la peau des Tritons. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 52, 343–357.
- Poisson, R. (1937) Sur une nouvelle espèce du genre *Dermomycoïdes* Granata 1919: *Dermomycoïdes armoriacus* Poisson 1936 parasite cutané de *Triturus palmatus* (Schneider): genèse et structure de la zoospore. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique (Woods Hole)*, 71, 91–116.
- Raffel, T.R., Dillard, J.R. & Hudson, P.J. (2006) Field evidence of leech-borne transmission of amphibian *Ichthyophonus* sp. *Journal of Parasitology*, 92(6), 1256–1264.
- Raffel, T.R., Bommarito, T., Barry, D.S., Witiak, S.M. & Shackelton, L.A. (2008) Widespread infection of the Eastern red-spotted newt (*Notophthalmus viridescens*) by a new species of *Amphibiocystidium*, a genus of fungus-like mesomycetozoan parasites not previously reported in North America. *Parasitology*, 135(2), 203–215.
- Reichenbach-Klinke, H. & Elkan, E. (1965) *The principal diseases of lower vertebrates*. Academic Press, London & New York, 600 p.
- Remy, P. (1931) Presence de *Dermocystidium ranae* (Guyénot et Naville) chez une *Rana esculenta* L. de Lorraine. *Annals de Parasitologie*, 9, 1–3.
- Rowley, J.J.L., Gleason, F.H., Andreou, D., Marshall, W.L., Lilje, O. & Gozlan, R. (2013) Impacts of mesomycetozoan parasites on amphibian and freshwater fish populations. *Fungal Biology Reviews*, 27, 100–111.
- Scheid, P., Balczun, C., Dehling, J.M., Ammon, A. & Sinsch, U. (2015) Rhinosporidiosis in African reed frogs *Hyperolius spp.* caused by a new species of *Rhinosporidium*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 115(2), 111–120.
- Schlumberger, H.H. & Lucké, B. (1948) Tumors of fishes, amphibians and reptiles. *Cancer Research*, 8, 657–754.
- Shively, J.N., Songer, J.G., Prchal, S., Keasey III, M. & Thoen, C.O. (1981) *Mycobacterium marinum* infection in Bufonidae. *Journal of Wildlife Diseases*, 17(1), 3–7.
- Silva, V., Pereira, C.N., Ajello, L. & Mendoza, L. (2005) Molecular evidence for multiple host-specific strains in the genus *Rhinosporidium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1865–1868.
- Taylor, S.K., Williams, E.S., Pier, A.C., Mills, K.W. & Bock, M.D. (1999) Mucormycotic dermatitis in captive adult Wyoming toads. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(1), 70–74.
- Vilela, R. & Mendoza, L. (2012) The taxonomy and phylogenetics of the human and animal pathogen *Rhinosporidium seeberi*: A critical review. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(4), 185–199.



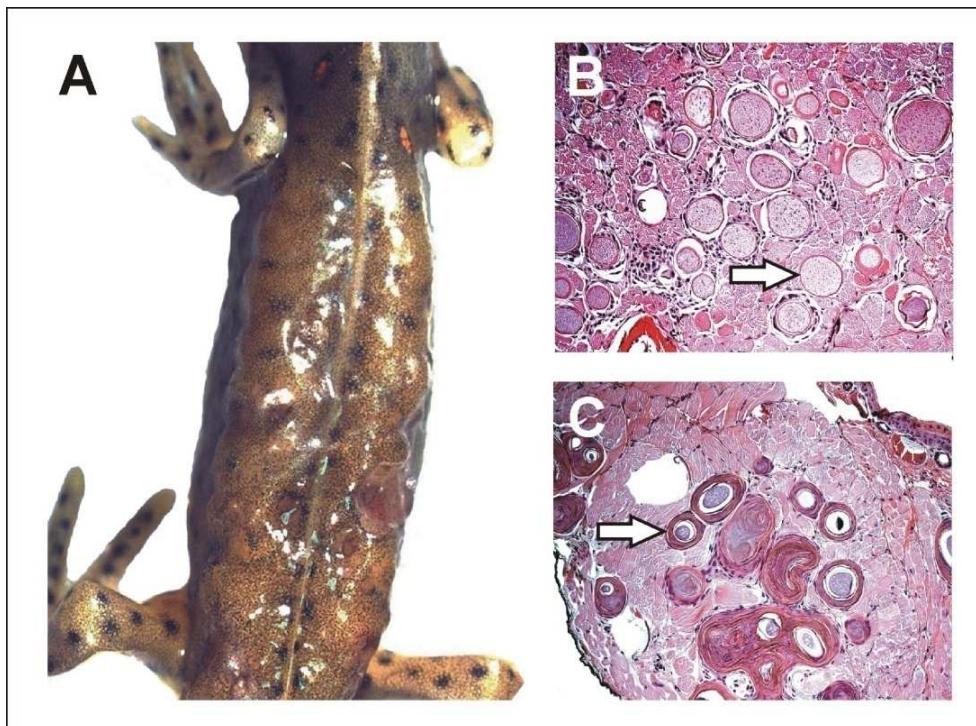
## Ictiofonosis en *Hypsiboas pulchellus*

### Resumen

Este Capítulo reporta por primera vez la infección por *Ichthyophonus* sp. (Eccrinida, Ichthyosporea) en anfibios fuera de Norteamérica. Estos parásitos producen una infección granulomatosa en músculos y piel potencialmente mortal. La infección se detectó en un ejemplar juvenil de *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae) colectado en Paso Mauricio, sur de Uruguay. El ejemplar presentaba una tumoración en la región dorsal posterior y aparentaba estar en buena condición. Al corte histológico dicha tumoración presentó una infección granulomatosa con numerosos esporangios parasitarios que se extendieron por la musculatura axial hasta la región dorsal anterior. Los esporangios estaban en distintos estadios de evolución, en reposo, sincitial, fibroso y maduro, característicos de la infección por *Ichthyophonus*. Se discute el posible origen de esta infección a partir de la introducción de Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*).

## Introducción

El Orden Eccrinida (= Ichthyophonida; Ichthyosporaea) incluye parásitos de peces, anfibios, moluscos, crustáceos e insectos, y también organismos saprófitos como *Sphaeroforma artica*, cuyos ciclos de vida son poco conocidos (Mendoza *et al.* 2002; Glockling *et al.* 2013). El patógeno *Anurofeca richardsi*, confundido durante mucho tiempo con algas del género *Prototheca*, se desarrolla en el intestino de larvas de anfibios y puede causar inhibición del crecimiento (Wong & Beebee 1994; Mendoza *et al.* 2002). Son capaces de producir una enfermedad sistémica granulomatosa, crónica y potencialmente letal que afecta la piel, músculos y órganos internos (Rahimian 1998; Kocan *et al.* 1999; Raffel *et al.* 2006). Los esporangios pueden permanecer inactivos en los tejidos del hospedador junto a otros con distinto grado de actividad (Rahimian 1998). Imágenes de patología macro y microscópica se indican en la figura 8.1.



**FIGURA 8.1.** Infección por *Ichthyophonus* en el tritón *Notophthalmus viridescens*. **A**, ejemplar adulto con tumoraciones y ulceración en el dorso. **B**, corte histológico de músculos con numerosos esporangios activos (flecha). **C**, músculos con esporas en reposo (flecha). Fotos gentileza de Thomas Raffel.

Se ha descrito una forma infectante unicelular ameboide con motilidad que una vez dentro del hospedador desarrolla un esporangio que produce numerosas endosporas con la capacidad de reiniciar el ciclo nuevamente (Mendoza *et al.* 2002). Al igual que en Dermocystida no se ha podido lograr la transmisión directa (Gregg *et al.* 2012).

Las especies parásitas del género *Ichthyophonus* tienen gran importancia en peces y anfibios, pudiendo causar severo impacto a nivel poblacional (Møllergaard & Spanggaard 1997; Marty *et al.* 1998; Kocan & Harshbarger 2006; Hershberger *et al.* 2010).

Existen pocos estudios sobre ictiofonosis en anfibios. Goodchild (1953) publica los primeros casos en juveniles de Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*) de EEUU en los que observa granulomas en el urostilo, y denomina al agente infeccioso *Histocystidium ranae*. Posteriormente la infección es encontrada en otros anuros y salamandras de América del Norte (Herman 1984; Mikaelian *et al.* 2000; Green *et al.* 2002; Ware *et al.* 2008). Raffel *et al.* (2006) encuentran una asociación entre la infección por *Ichthyophonus* en anfibios y parasitosis por sanguijuelas, sugiriendo que éstas podrían ser vectores de la enfermedad. En ocasiones la enfermedad en anfibios ha sido confundida con la adiaspiromicosis, causada por hongos del género *Chrysosporium* (Hill & Parnell 1996; ver Berger & Green 2012).

En este Capítulo se describe el primer caso de infección por Eccrinida en anfibios fuera de Norteamérica, en una localidad del sur de Uruguay.

## Objetivos

### Objetivo general

Describir un caso de infección por *Ichthyophonus* sp. en un anfibio nativo de Uruguay.

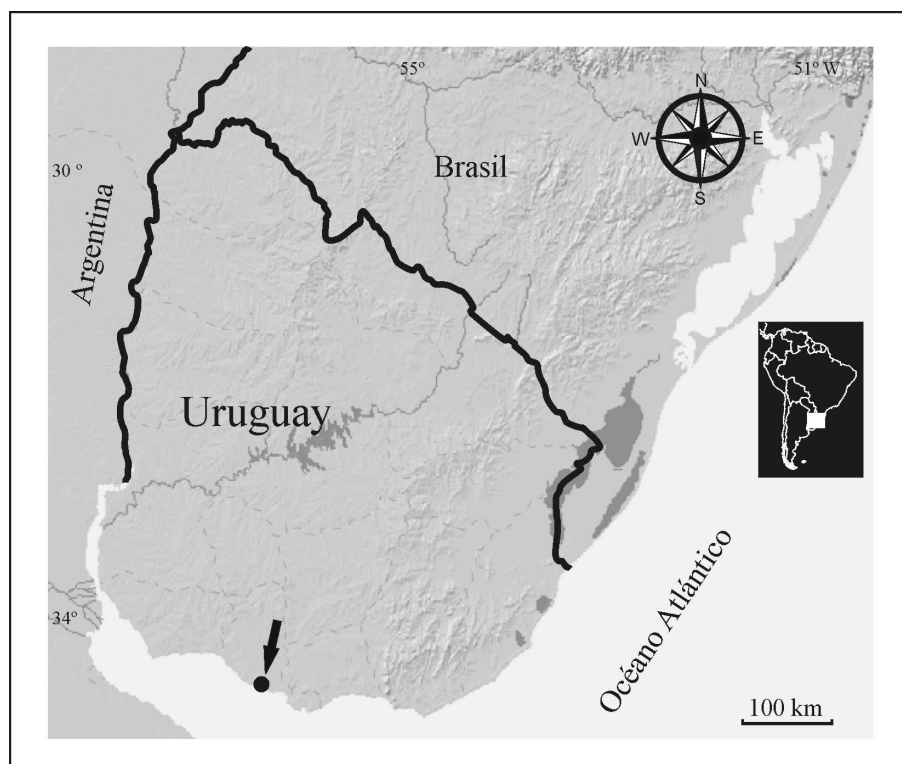
### Objetivos específicos

- 1) Caracterizar la infección desde un punto de vista anátomo-patológico e histológico.
- 2) Discutir el posible origen de los microorganismos involucrados y su importancia epidemiológica.

## Materiales y Métodos

### Sitio de estudio y hábitat

La localidad de estudio fue un cuerpo de agua próximo al Arroyo Mauricio, en la localidad Paso Mauricio, Dpto. de San José (34°40'58" S, 56°41'19" W; 3 m s.n.m.), figura 8.2. El hábitat consistió en un charco temporario de la planicie de inundación del arroyo, que presentaba una profundidad máxima de aproximadamente 1 m, figura 8.3. El ambiente circundante inmediato es de monte en galería y praderas naturales con grado de antropización variable, en un matriz de paisaje agrícola. El charco recibe intermitentemente el desborde del Arroyo Mauricio y está habitado por peces, siendo abundantes las "madrecitas de agua" *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae).



**FIGURA 8.2.** Infección por *Ichthyophonus* sp. en *Hypsiboas pulchellus*, ubicación geográfica del sitio de estudio, Paso Mauricio, Dpto. de San José.



**FIGURA 8.3.** Hábitat del sitio de estudio en Paso Mauricio, cuerpos de agua próximos al cauce del Arroyo Mauricio (18/V/2014).

## Material de estudio

El 2 de noviembre de 2007 durante horas del día se observaron dos ejemplares juveniles de *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae) entre matas de *Eryngium* en torno a charcos temporales. Uno de ellos (MNHN 9505) presentó una tumoración en el dorso, fue trasladado al laboratorio donde se practicó la eutanasia. Se practicó un examen post-mortem y se tomaron muestras con motivo de realizar preparaciones histológicas de la lesión; los procedimientos se detallan en el Capítulo 2.

Adicionalmente se examinaron lotes de larvas de anfibios del mismo charco colectadas entre el 4 de noviembre y el 9 de diciembre de 2007 (n = 126): *Dendropsophus sanborni* (n = 8, estadios 31–41), *Hypsiboas pulchellus* (n = 69, estadios 25–42), *Leptodactylus latrans* (n = 2, estadio 40) y *Scinax granulatus* (n = 47, estadios 31–42).



# Resultados

## Lesiones macroscópicas

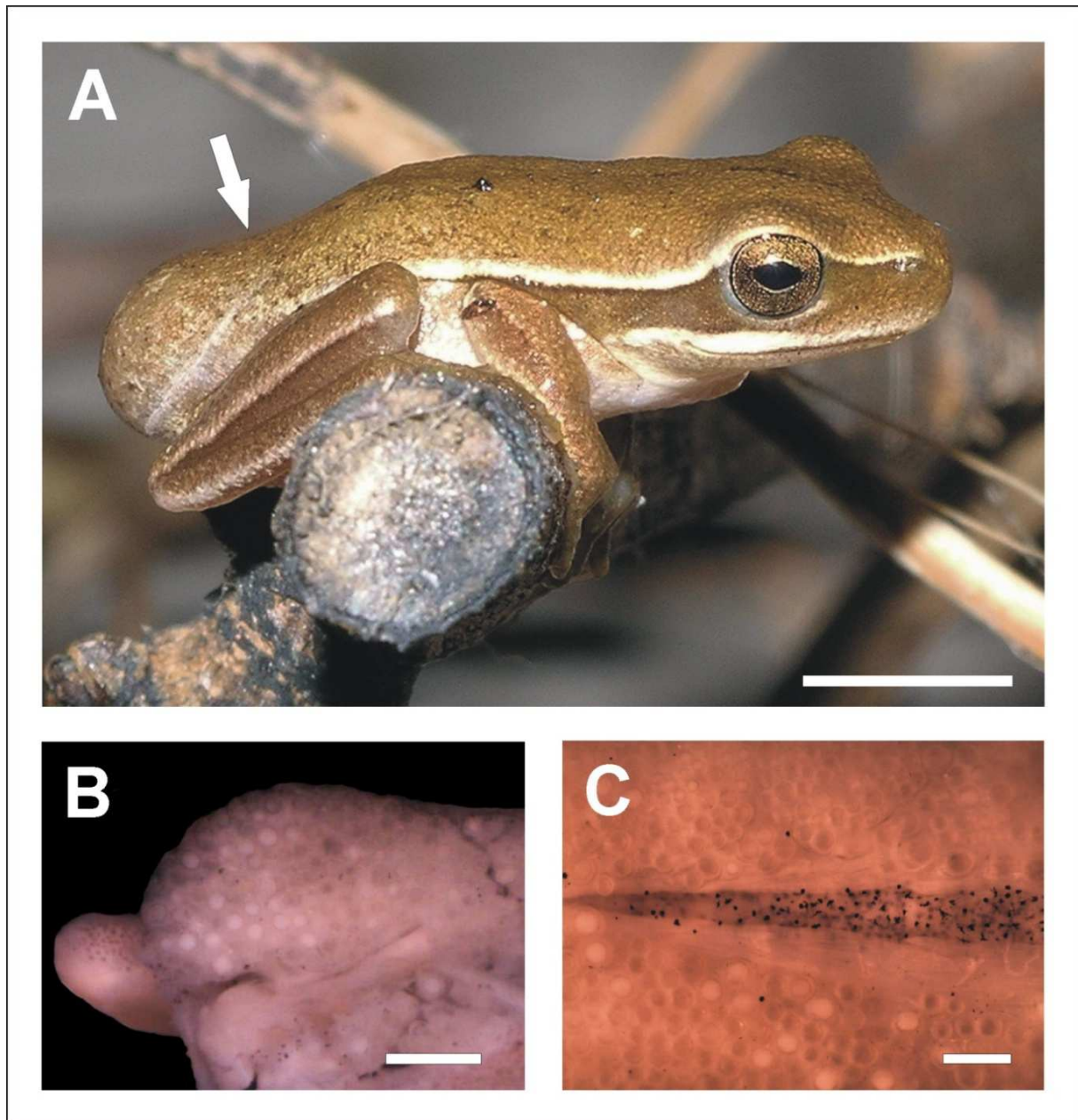
El ejemplar estudiado (MNHN 9505) presentó una tumoración en la zona posterior del dorso, de aspecto liso, de aproximadamente 5 mm de longitud y 3 mm de ancho, sin otras malformaciones aparentes, figura 8.4. A la disección se observaron múltiples esporangios en el tejido subcutáneo que ocupaban toda la tumoración. Los esporangios se extendieron por aproximadamente los dos tercios posteriores de la musculatura axial. No se observó ulceración de la piel o tumoraciones en la cabeza o miembros. A la disección tampoco se observaron esporangios en la cavidad celómica. El resto de los ejemplares estudiados no presentó lesiones macroscópicas a destacar.

## Histopatología

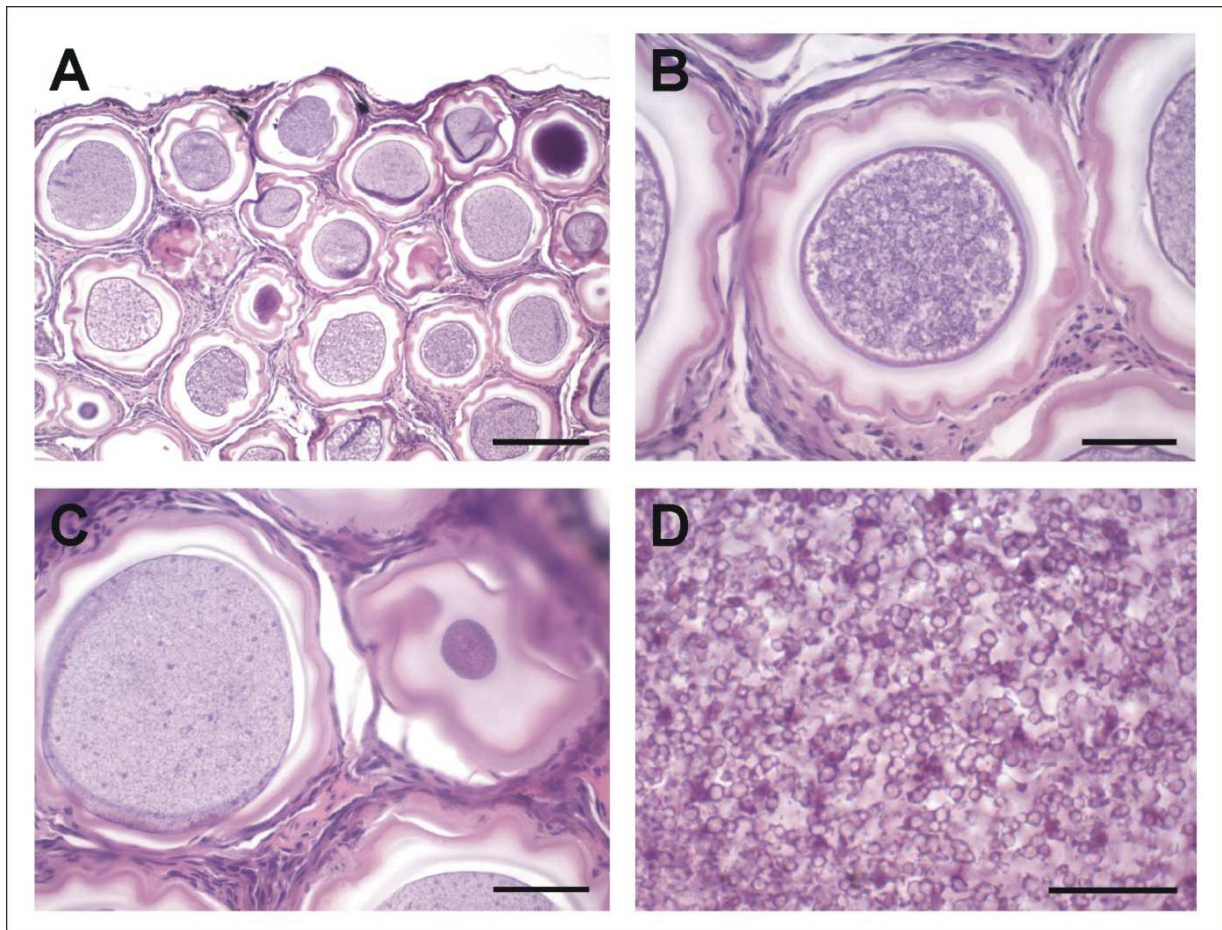
Al examen microscópico de la tumoración se observaron cientos de esporangios contiguos, más o menos circulares, de aproximadamente 100 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los esporangios se extendieron por debajo la epidermis hasta los planos musculares profundos, pero no se observaron entre las fibras musculares. Unos pocos se situaron por debajo de músculos lumbares, dentro de la cavidad celómica. Los esporangios tienen doble pared, la más externa de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  que tiene una coloración eosinofílica. Esta cápsula externa es ondulada, presentándose menos anfractuosa cuanto más grande (y maduro) es el esporangio. La membrana interna es más fina que la externa, basófila, y en su interior están las esporas. Entre ambas se observa un espacio que aparentemente corresponde a un artefacto de la técnica histológica.

El aspecto de los esporangios fue variable, aquellos en actividad presentaban un aspecto de sincitio, mientras que en los más grandes presentaban un estado fibroso (según Goodchild 1953) o bien estaban ya maduros, repletos de esporas. En los sincitios los núcleos son visibles pero lo son aún más en los fibrosos. Los más pequeños estaban en estado de reposo, con un contenido de aspecto más denso. Las esporas miden aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  adquieren una coloración levemente basófila en la pared celular. En numerosos sitios entre los esporangios

se observó un infiltrado de células inflamatorias. Imágenes representativas de los distintos estadios evolutivos se muestran en la figura 8.5.



**FIGURA 8.4.** Infección por *Ichthyophonus* sp. en un ejemplar juvenil de *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9505, lesiones macroscópicas. **A**, se observa una tumoración en la región dorsal posterior, la flecha indica el límite anterior aproximado. Barra = 5 mm. Foto: Francisco Kolenc. **B**, vista macroscópica de un corte sagital de la tumoración, conteniendo numerosos esporangios. Barra = 1 mm. **C**, superficie de los músculos dorsales afectados por el granuloma, luego de removida la piel. Barra = 500  $\mu$ m.



**FIGURA 8.5.** Infección por *Ichthyophonus* sp. en *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9505, cortes histológicos, tinción H&E. **A**, corte sagital de tumoración sub-epidérmica en vista panorámica, se observan esporangios en diverso grado de desarrollo. Barra = 200  $\mu$ m. **B**, esporangio activo en estado sincitial. Barra = 50  $\mu$ m. **C**, esporangio activo en estado fibroso (izquierda), contiguo a uno en reposo (derecha). Barra = 50  $\mu$ m. **D**, contenido de un esporangio maduro repleto de esporas. Barra = 20  $\mu$ m.

## Diagnóstico microbiológico y anatomopatológico diferencial

El diagnóstico de ictiofonosis se realizó en base a la siguiente combinación de caracteres macro y microscópicos: 1) presencia de una tumefacción en la zona dorsal posterior de un ejemplar juvenil; 2) infección quística granulomatosa con cientos de pequeños esporangios; 3) esporangios con doble pared en distinto grado de actividad, los más maduros repletos de endosporas.

En un ejemplar adulto de *Hypsiboas pulchellus* (MNHN 9504) de La Paloma, Dpto. de Rocha, se observó una tumoración de localización, aspecto y tamaño muy similares a la descrita. A la disección se encontró una parasitosis por una larva plerocercoides de tenias del género *Spirometra*, ver Capítulo 10. En otro caso, un ejemplar de *Melanophryniscus sanmartini* colectado en Valentines, Dpto. de Treinta y Tres (MNHN 9510) presentó una

tumoración también similar en aspecto y localización a la descrita para el ejemplar MNHN 9505, pero la lesión observada correspondió a una neoplasia benigna (lipoma), ver Capítulo 11. Otras enfermedades de la piel de los anfibios pueden presentar tumoraciones similares a las causadas por *Ichthyophonus*, principalmente diversas neoplasias y varias enfermedades infecciosas granulomatosas. En el caso de estas últimas (ej. cromomicosis, mucormicosis y micobacteriosis) los granulomas son difusos sin la formación de esporangios, ver Apéndice 1.

## Discusión

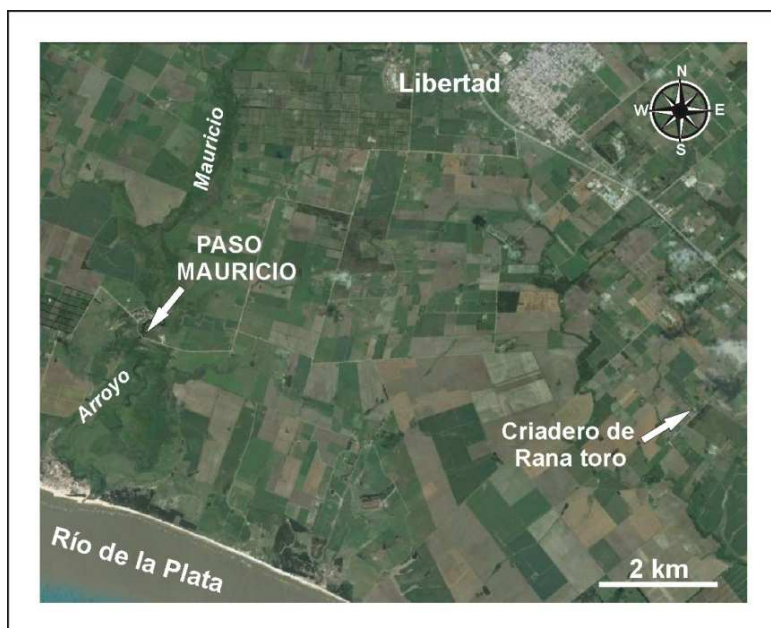
Las características macroscópicas de la infección observada en un ejemplar de *Hypsiboas pulchellus* proveniente de Paso Mauricio en el sur de Uruguay coincide con lo conocido para las infecciones por *Ichthyophonus* en anfibios (Goodchild 1953; Raffel *et al.* 2006; Berger & Green 2012). Al igual que en el presente estudio, Goodchild (1953) describe la ocurrencia de tumoraciones en la región dorsal posterior de ejemplares juveniles de la Rana toro norteamericana *Lithobates catesbeianus*. Este autor plantea la posibilidad de que la infección se establezca durante la metamorfosis cuando la cola está en reabsorción. No se observaron tumoraciones múltiples, ulceración de la piel o miositis granulomatosa como las descritas en infecciones por *Ichthyophonus* en anfibios adultos y peces (Rahimian 1998; Mikaelian *et al.* 2000; Raffel *et al.* 2006). El cuadro observado en *Hypsiboas pulchellus* es seguramente de evolución crónica y si bien el ejemplar se muestra en apariencia en buen estado, la infección puede ser potencialmente severa debido a la posibilidad de reinfección y diseminación a partir de quistes activos, potencialmente retrasando el desarrollo por disminución de la eficiencia alimentaria y aumentando del riesgo de predación.

La histopatología de la lesión observada en *Hypsiboas pulchellus* es también coincidente con lo conocido para infecciones por *Ichthyophonus*, en las que pueden encontrarse esporangios con diferente aspecto, asimilables a su actividad y grado de maduración (Goodchild 1953). Aquellos en reposo se presentaron contraídos, con la cápsula externa sinuosa como los ya descritos para anfibios y peces en su misma condición (Marty *et al.* 1998; Rahimian 1998; Raffel *et al.* 2006). Al igual que lo descrito por Goodchild (1953), los esporangios activos son en principio sincitios o esporas multinucleadas y evolucionan a un estadio repleto de pequeñas esporas que se tiñen pobremente. Miller *et al.* (2009) encuentran que en juveniles de *Lithobates clamitans* aumenta la pigmentación en los tejidos circundantes

a las lesiones cuando el número de esporangios es alto, lo cual no fue observado en el ejemplar de *H. pulchellus*.

Los hallazgos de infección por *Ichthyophonus* en anfibios previos a este estudio se realizaron en poblaciones silvestres de especies nativas de Estados Unidos y Canadá, en las que se asociaron a episodios naturales de morbilidad y mortalidad (Goodchild 1953; Herman 1984; Mikaelian *et al.* 2000, Green *et al.* 2002; Raffel *et al.* 2006; Burton 2007; Sherman *et al.* 2009). El diagnóstico de infección por *Ichthyophonus* en *Hypsiboas pulchellus* en el sur de Uruguay constituye el primer registro en anfibios de la Región Neotropical, y su potencial impacto es aún desconocido.

El origen de esta infección en anfibios nativos merece ser estudiado. Una posibilidad es la transmisión de un parásito de peces a una especie de anfibio. En el caso de tratarse de parásitos de anfibios debe tenerse en cuenta el que Paso Mauricio dista unos 9,5 km de un criadero de Rana toro norteamericana *Lithobates catesbeianus*, figura 8.6. Esta especie es potencialmente portadora de infección por *Ichthyophonus* (Goodchild 1953; Mikaelian *et al.* 2000; Green *et al.* 2002; Miller *et al.* 2009). El mencionado criadero se estableció en 1998 con ejemplares de *L. catesbeianus* importados desde Brasil (Mazzoni *et al.* 2003), y siguió activo al menos hasta el año 2010 inclusive (observación personal). Estudios complementarios de campo y moleculares permitirían caracterizar las cepas de *Ichthyophonus* encontrados en *Hypsiboas pulchellus* del sur de Uruguay.



**FIGURA 8.6.** Ubicación de un criadero de Rana toro norteamericana cercano al sitio de estudio Paso Mauricio, próximo a Libertad, Dpto. de San José (imagen de fondo captada de Google Earth, 18/V/2014).

## Referencias

- Berger, L. & Green, D.E. (2012) Amphibian Diseases. En: *Wildlife Pathology Short Course*, Camden, Sydney, Australian Registry of Wildlife Health, pp. 26–48. Disponible en: <http://www.arwh.org/sites/default/files/files-uploads/04%20AMPHIBIAN%20DISEASES.pdf> (accedido el 26 de mayo de 2014)
- Burton, E. (2007) *Influences of cattle on postmetamorphic amphibians on the Cumberland Plateau*. Tesis de Maestría, University of Tennessee, Knoxville, 200 p.
- Glockling, S.L., Marshall, W.L. & Gleason, F.H. (2013) Phylogenetic interpretations and ecological potentials of the Mesomycetozoa (Ichthyosporea). *Fungal Ecology*, 6(4), 237–247.
- Goodchild, C.G. (1953) A subcutaneous, cyst-parasite of Bullfrogs: *Histocystidium ranae*, n. g., n. sp. *Journal of Parasitology*, 39(4), 395–405.
- Green, D.E., Converse, K.A. & Schrader, A.K. (2002) Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the U.S.A., 1996–2001. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969, 323–339.
- Gregg, J.L., Grady, C.A., Friedman, C.S. & Hershberger, P.K. (2012) Inability to demonstrate fish-to-fish transmission of *Ichthyophonus* from laboratory infected Pacific herring *Clupea pallasii* to naïve conspecifics. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99(2), 139–144.
- Herman, R.L. (1984) *Ichthyophonus*-like infection in newts (*Notophthalmus viridescens* Rafinesque). *Journal of Wildlife Diseases*, 20(1), 55–56.
- Hershberger, P.K., van der Leeuw, B.K., Gregg, J.L., Grady, C.A., Lujan, K.M., Gutenberger, S.K., Purcell, M.K., Woodson, J.C., Winton, J.R. & Parsley, M.J. (2010) Amplification and transport of an endemic fish disease by an introduced species. *Biological Invasions*, 12(11), 3665–3675.
- Hill, J.E. & Parnell, P.G. (1996) Adiaspiromycosis in bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(4), 496–497.
- Kocan, R. & Hershberger, P. (2006) Differences in *Ichthyophonus* prevalence and infection severity between upper Yukon River and Tanana River chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), stocks. *Journal of Fish Diseases*, 29(8), 497–503.
- Kocan, R.M., Hershberger, P., Mehl, T., Elder, N., Bradley, M., Wildermuth, D. & Stick, K. (1999) Pathogenicity of *Ichthyophonus hoferi* for laboratory-reared Pacific herring *Clupea pallasii* and its early appearance in wild Puget Sound herring. *Diseases of Aquatic Organisms*, 35(1), 23–29.
- Marty, G.D., Freiberg, E.F., Meyers, T.R., Wilcock, J., Farver, T.B., Hinton, D.E. (1998) Viral hemorrhagic septicemia virus, *Ichthyophonus hoferi*, and other causes of morbidity in Pacific herring *Clupea pallasii* spawning in Prince William Sound, Alaska, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32(1), 15–40.
- Mazzoni, R., Cunningham, A.A., Daszak, P., Apolo, A., Perdomo, E., Speranza, G. (2003) Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 995–998.
- Møllergaard, S. & Spanggaard, B. (1997) An *Ichthyophonus hoferi* epizootic in herring in the North Sea, the Skagerrak, the Kattegat and the Baltic Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 28(3), 191–199.
- Mendoza, L., Taylor, J.W. & Ajello, L. (2002) The

- Class Mesomycetozoa: a heterogeneous group of microorganisms at the Animal-Fungal boundary. *Annual Review of Microbiology*, 56, 315–344.
- Mikaelian, I., Ouellet, M., Pauli, B. Rodrigue, J., Harshbarger, J.C. & Green, D.M. (2000) *Ichthyophonus*-like infection in wild amphibians from Québec, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40(3), 195–201.
- Miller, D.L., Gray, M.J., Rajeev, S., Schmutzer, A.C., Burton, E.C., Merrill, A. & Baldwin, C.A. (2009) Pathologic findings in larval and juvenile anurans inhabiting farm ponds in Tennessee, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(2), 314–324.
- Raffel, T.R., Dillard, J.R. & Hudson, P.J. (2006) Field evidence of leech-borne transmission of amphibian *Ichthyophonus* sp. *Journal of Parasitology*, 92(6), 1256–1264.
- Rahimian, H. (1998) Pathology and morphology of *Ichthyophonus hoferi* in naturally infected fishes of the Swedish west coast. *Diseases of Aquatic Organisms*, 34(2), 109–123.
- Sherman, E., Tock, K. & Clarke, C. (2009) Fluctuating asymmetry in *Ichthyophonus*-sp. infected newts, *Notophthalmus viridescens*, from Vermont. *Applied Herpetology*, 6, 369–378.
- Ware, J.L., Viverette, C., Kleopfer, J.D., Pletcher, L., Massey, D. & Wright, A. (2008) Infection of Spotted Salamanders (*Ambystoma maculatum*) with *Ichthyophonus*-like Organisms in Virginia. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(1), 174–176.
- Wong, A. & Beebee, T. (1994) Identification of a unicellular, non-pigmented alga that mediates growth inhibition in anuran tadpoles: a new species of the genus *Prototheca* (Chlorophyceae: Chlorococcales). *Hydrobiologia*, 277(2), 85–96.

# IV

## OTRAS ENFERMEDADES

El estudio de aspectos biológicos de anfibios del Uruguay comenzó a principios del siglo XX con los trabajos pioneros de Ergasto Cordero sobre parasitología en diversas especies (Cordero 1919; 1919a). El conocimiento sobre patología de anfibios nativos fue continuado con trabajos parasitológicos, sobre el hallazgo de micro y macroparásitos, hongos patógenos y ocasionalmente protozoarios (Vogelsang 1925; Cordero 1933; Stensaas *et al.* 1967; Dei-Cas & Mañé-Garzón 1971; Mañé-Garzón & González 1978; ver también Capítulo 3). En esta sección se comunica el hallazgo de otras patologías de la piel causadas por cestodes, larvas de ácaros y neoplasias.

Cordero, E.H. (1919) *Cystodiscus immersus* Lutz.  
Mixosporidio de los batracios del Uruguay.  
*Physis*, 4, 403–409.

Cordero, E.H. (1919a) *Opalinia antillensis* Metcalf.  
Ciliado parásito de los batracios del Uruguay. *Physis*, 4, 531–535.

Cordero, E.H. (1933) Sur quelques acantocéphales de L'Amérique Méridionale, I. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 11(4), 271–279.

Dei-Cas, E. & Mañé-Garzón, F. (1971) Cromoblastomycosis espontánea en un anfibio del Uruguay. *Revista Uruguaya de Patología Clínica y Microbiológica*, 9, 12–23.

Mañé-Garzón, F. & González, L.E. (1978) *Gorgoderina darwini* n. sp. digenea parásito de la vejiga urinaria del sapito de Darwin *Melanophryniscus stelzneri* (Weyenbergh). *Revista de Biología del Uruguay*, 6(1), 39–43.

Stensaas, L.J., Stensaas, S.S. & Sotelo, J.R. (1967) An intra-axonal protozoon in the spinal cord of the toad *Bufo arenarum* (Hensel). *Journal of Protozoology*, 14(4), 585–595.

Vogelsang, E.G. (1925) La presencia de un *sparganum* en las ranas (*Leptodactylus ocellatus*) del Uruguay. *Revista de Medicina Veterinaria*, 2, 301.





## Esparganosis en *Hypsiboas pulchellus*

### Resumen

Se describen los primeros registros de infestación por formas larvales de tenias del género *Spirometra* (esparganos) en el anuro *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae). Se estudiaron 139 ejemplares de dicha especie colectados en los alrededores de La Paloma y Laguna de Rocha, Dpto. de Rocha, en el sureste de Uruguay. Dos de ellos presentaron un espargano (1,4 %), en un caso en forma libre en la cavidad celómica. En el otro ejemplar el parásito estaba localizado bajo la piel, y se extendía hacia la cavidad celómica. Se discute la importancia de este hallazgo, junto con una revisión de la información disponible sobre la esparganosis en Uruguay.

---

Los resultados de esta sección fueron publicados en el transcurso de este estudio (ver Apéndice 9):

Borteiro, C., Castro, O., Sabalsagaray, M.J., Kolenc, F., Martínez Debat, C. & Ubilla, M. (2015) Spargana in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) from Uruguay. *Northwestern Journal of Zoology*, 11(1), 171–173.

## Introducción

La esparganosis es una enfermedad parasitaria cosmopolita causada por esparganos o larvas plerocercoides de tenias del género *Spirometra*, actualmente incluidos en la familia Diphyllbothriidae (Platyhelminthes, Eucestoda; ver Kuchta *et al.* 2008). Los adultos habitan el intestino de cánidos y félidos, y sus huevos dan origen a formas ciliadas o coracidios que al ser ingeridos por crustáceos acuáticos se transforman en larvas procercoides, que una vez consumidos por vertebrados pueden desarrollar el plerocercoides de localización cutánea o visceral; el ciclo puede incluir hospedadores paraténicos predadores de vertebrados infestados (Mueller 1974; Bowman *et al.* 2002). La esparganosis es una zoonosis poco frecuente pero potencialmente mortal, que puede ocurrir en el hombre por consumo de carne de reptiles o anfibios insuficientemente cocida conteniendo plerocercoides, por estrecho contacto con las mismas o por la ingestión de agua con copépodos portadores de procercoides (Sakamoto *et al.* 2003; Hou *et al.* 2012). La esparganosis humana es particularmente importante en Asia (Chi *et al.* 1980; Hou *et al.* 2012).

En Uruguay el primer reporte de plerocercoides de *Spirometra* es el de Vogelsang (1925), quien encuentra esparganos en anfibios *Leptodactylus latrans*, enquistados en las masas musculares de los miembros posteriores. Poco después Wolffhügel & Vogelsang (1926) encuentran plerocercoides en la piel de los marsupiales autóctonos comadreja overa (*Didelphis albiventris*) y comadreja colorada (*Lutreolina crassicaudata paranalis*). Identifican a estos últimos como *Sparganum reptans*, que luego de ser administradas a un canino para completar el ciclo parasitario fueron asignados a *Dibothriocephalus decipiens*, actualmente en el género *Spirometra*. Dei-Cas *et al.* (1976) reportan el hallazgo de esparganos en varias especies de reptiles de Uruguay y nuevamente en ejemplares de *L. latrans* procedentes de Montevideo, Maldonado y Rocha. La infestación natural por *Spirometra* en felinos domésticos de Montevideo fue diagnosticada por Sampaio *et al.* (1987). Un segundo hallazgo en reptiles nativos es el reciente reporte de Crampet *et al.* (2008) en lagartos (*Salvator merianae*). En este trabajo se reporta el hallazgo de esparganos en anfibios anuros adultos de la especie *Hypsiboas pulchellus*, provenientes de La Paloma, Dpto. de Rocha.

# Objetivos

## Objetivo general

Reportar la infestación por larvas plerocercoides de tenias (*Spirometra*) en anuros de la especie *Hypsiboas pulchellus*.

## Objetivos específicos

- 1) Describir las lesiones macroscópicas e histopatología de la parasitosis.
- 2) Revisar la información disponible de la enfermedad en Uruguay y discutir su importancia en anfibios.

# Materiales y métodos

## Sitio de estudio

El trabajo de campo del presente estudio se realizó en el sur de Uruguay, en dos localidades costeras muy próximas entre sí en los alrededores de La Paloma (34°38'29" S, 54°12'39" W) y Laguna de Rocha (34°39'45" S, 54°13'14" W), Dpto. de Rocha. Los muestreos se realizaron como parte de los trabajos detallados en el Capítulo 8.

## Especímenes de estudio y procedimientos

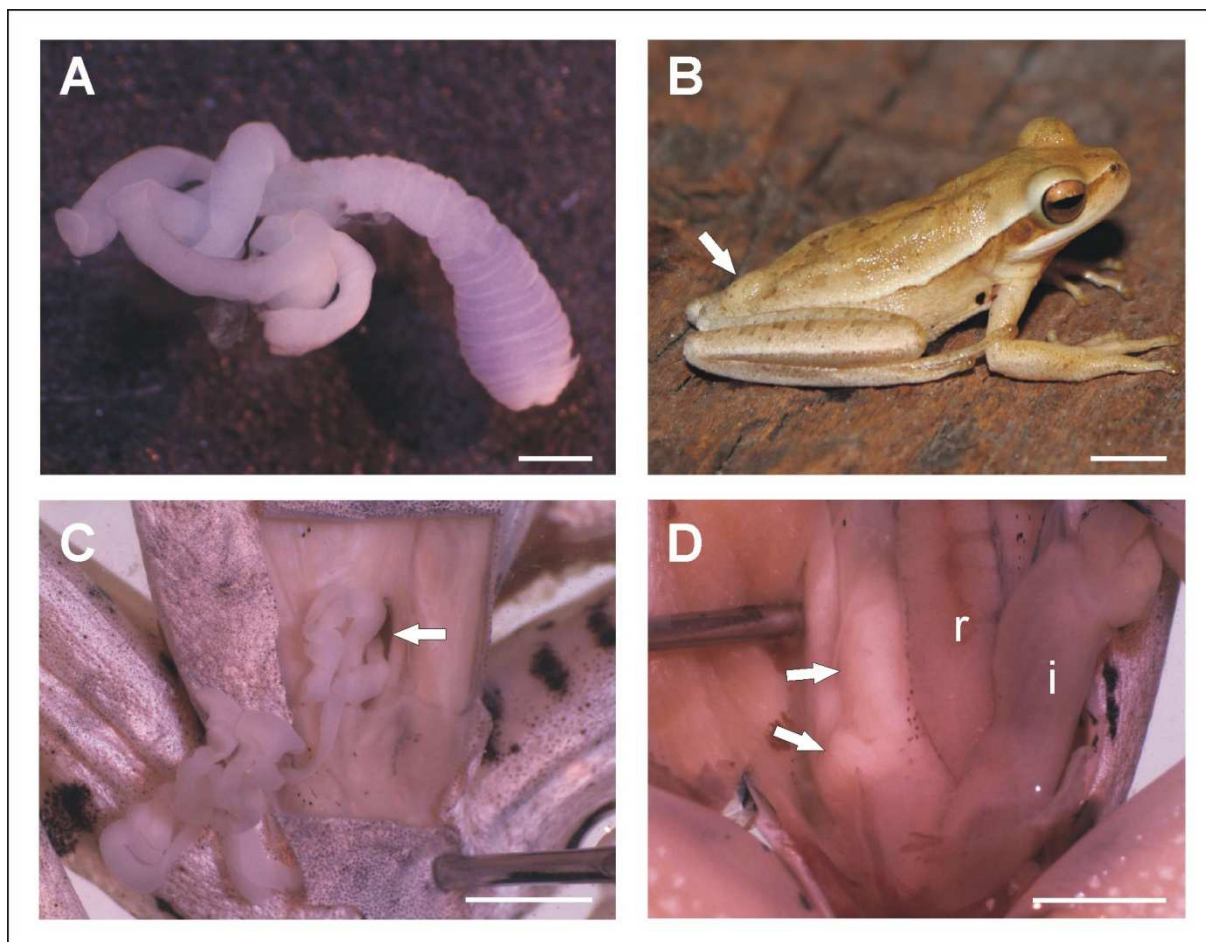
Entre setiembre de 2012 y abril de 2014 se colectaron 139 ejemplares adultos del anuro *Hypsiboas pulchellus* (ver Capítulo 8). Los mismos se procesaron como especímenes de estudio, se practicó un examen post-mortem con inspección de la cavidad celómica bajo lupa binocular a 10X y fotografiados según se detalla en el Capítulo 2. Los demás procedimientos

de laboratorio y acrónimos corresponden a lo detallado en dicha sección. Dos especímenes presentaron helmintos no intestinales en la cavidad celómica: MNHN 9503 de 32,8 mm LHC y MNHN 9504 de 36,4 mm LHC, colectados el 17 de agosto y 17 de abril de 2013 respectivamente. El hábitat donde se colectaron ambos ejemplares consistió en un charco permanente (tajamar) utilizado como abrevadero de ganado en una zona de praderas, ver figura 7.2 A del Capítulo 7.

## Resultados

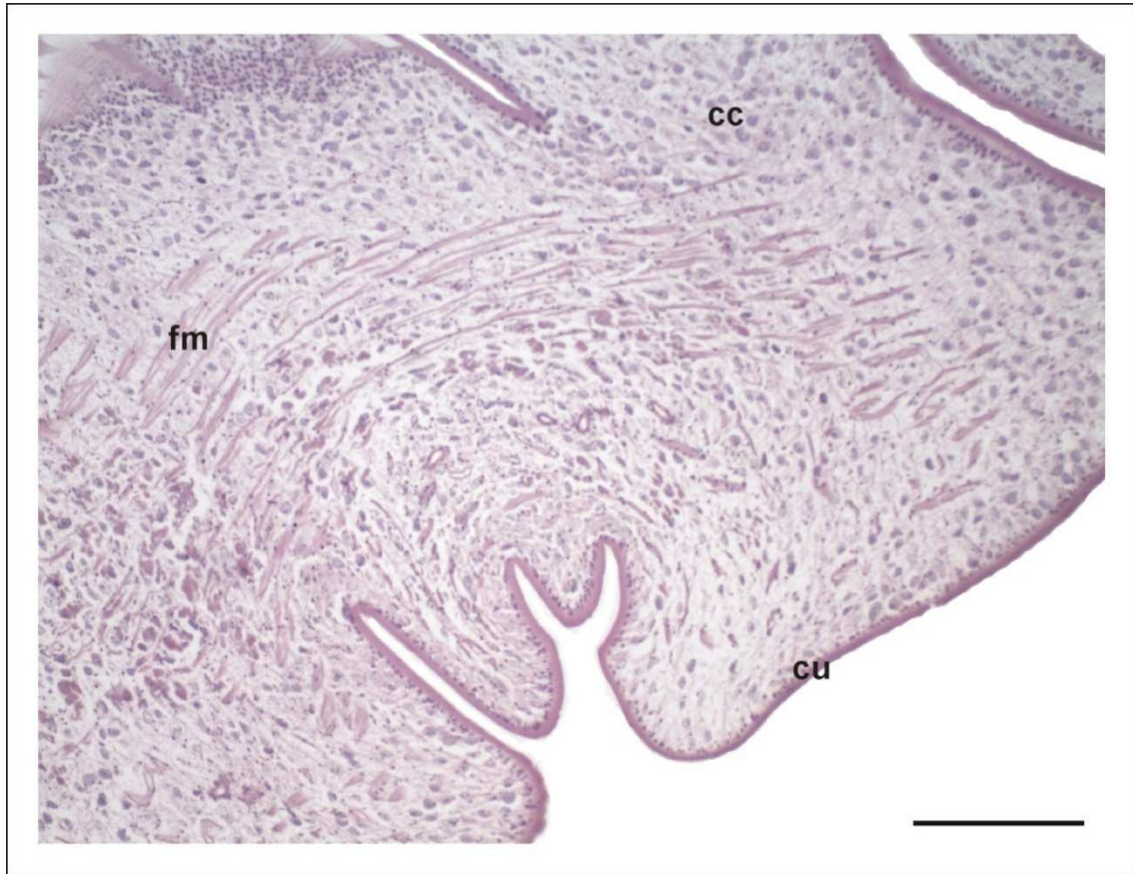
Ambos especímenes de *Hypsiboas pulchellus* se encontraban vocalizando en sitios de reproducción, aparentemente presentaban buen estado general, sin debilidad ni comportamientos o posturas anormales. Tampoco se observaron signos de enfermedad severa como necrosis, inflamación granulomatosa, hemorragia o ulceración de la piel (Berger *et al.* 2009). Los dos ejemplares fueron positivos a infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* diagnosticado por PCR (ver sección Materiales y métodos), y además el ejemplar MNHN 9504 presentaba dos nódulos por *Amphibiocystidium*, uno en el abdomen y otro contiguo a la tumoración causada por el helminto.

Los helmintos presentaron características típicas de larvas plerocercoides: cuerpo achatado de color blanquecino, relativamente ancho y enrollado, con un extremo ensanchado y pliegues transversales evidentes, figura 9.1 A. En el espécimen MNHN 9503, el plerocercuido midió 25 mm de largo, y estaba libre en la cavidad celómica. En espécimen MNHN 9504 se encontró una tumoración en la parte posterior del dorso de aproximadamente 4 x 2 mm, figura 9.1 B. Al ser disecada la tumefacción se observó la larva plerocercuido de 47 mm parcialmente ubicada en el tejido subcutáneo, extendiéndose a través de planos musculares dorsales hacia la cavidad celómica. Dentro de la cavidad celómica la misma estaba envuelta en una fina membrana blanquecina traslúcida, figura 9.1 C, D. La piel en correspondencia del sitio donde se hallaba la larva no presentó alteraciones visibles.



**FIGURA 9.1.** Infestación por esparganos en *Hypsiboas pulchellus*. **A**, espargano extraído de la cavidad celómica de un ejemplar adulto MNHN 9503, La Paloma, Dpto. de Rocha (17/VIII/2013). Nótese el extremo posterior ensanchado característico de la larva. Barra = 1 mm. **B**, ejemplar macho adulto MNHN 9504 de la misma localidad (17/IV/2013), se observa una tumoración en la región dorsal posterior (flecha). **C**, mismo ejemplar, a la disección de la tumoración se observa un espargano subcutáneo que se extiende hacia la cavidad celómica a través de un orificio entre los músculos dorsales (flecha). Barra = 2 mm. **D**, vista de la misma larva desde la cavidad celómica (flechas), envuelta en una fina membrana. Abreviaturas: i, intestino; r, riñón. Barra = 2 mm.

Al corte histológico se observaron características diagnósticas de larvas de cestodos como ser una gruesa cutícula, presencia de corpúsculos calcáreos, ausencia de tubo digestivo y grupos de fibras musculares dispersas por el parénquima, figura 9.2.



**FIGURA 9.2.** Corte histológico de espargado extraído de *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9504, tinción H&E. Abreviaturas: fm, fibras musculares; cu, cutícula; cc, corpúsculos calcáreos. Barra = 200  $\mu$ m.

## Discusión

En el presente estudio se encuentra por primera vez a *Hypsiboas pulchellus* como hospedador intermediario de larvas plerocercoides de *Spirometra*. La presencia de plerocercoides en anfibios adultos de hábitos no acuáticos como *H. pulchellus* probablemente se debe a infestación durante la fase larval por el consumo accidental de copépodos (Venturini 1989).

La prevalencia de plerocercoides fue baja (1,4 %) al igual que la carga parasitaria, una larva por hospedador. Algunos reportes sobre esparganosis en anfibios adultos registran bajas cargas parasitarias (Vogelsang 1925; Gomez-Puerta *et al.* 2010). Sin embargo, la incidencia y carga pueden ser altas (Cui *et al.* 2011; Bezerra *et al.* 2012) e incluso causar enfermedad severa en condiciones naturales (Berger *et al.* 2009). El registro de bajas cargas parasitarias está muy influido por el esfuerzo de muestreo y el tamaño de la muestra, ya que altas

concentraciones de parásitos son hallazgos raros en la población de hospedadores (Poulin 2013).

La localización de los esparganos en anfibios adultos es variable, las larvas parasitarias migrantes se ubican en el tejido subcutáneo, músculo estriado, epitelio celómico, hígado y libres en cavidad celómica (Rego & Schäffer 1992; Berger *et al.* 2009; Bezerra *et al.* 2012). La doble localización subcutánea y celómica del espargano hallado en el ejemplar MNHN 9504 es novedosa. En ninguno de los dos casos estudiados en *Hypsiboas pulchellus* los ejemplares parecían estar severamente afectados por la enfermedad. La incidencia y virulencia de los plerocercoides en ésta y otras especies nativas de anfibios amerita más estudios sobre prevalencia. El rango de hospedadores intermediarios de *Spirometra* es amplio y muchas especies nativas de anfibios podrían verse potencialmente afectadas (Berger *et al.* 2009).

Los reportes previos de esparganosis en anfibios de Uruguay y la región mencionan larvas plerocercoides de pequeño tamaño, entre 2 y 32 mm (Vogelsang 1925; Gomez *et al.* 2010; Bezerra *et al.* 2012). Berger *et al.* (2009) encuentran esparganos de *Spirometra erinacei* en anfibios de Australia cuyo tamaño fue variable, midiendo hasta 50 mm. La identidad de larvas plerocercoides halladas en anfibios de Uruguay debería ser estudiada con la reproducción del ciclo biológico en condiciones experimentales.

En Uruguay existen solamente dos casos registrados de esparganosis en humanos, ambos probablemente debidos al consumo de agua contaminada con copépodos (Osimani & Peyrallo 1954; Sakamoto *et al.* 2003). En este país el riesgo epidemiológico de esparganosis humana debida a la utilización de anfibios es extremadamente bajo. Los anfibios no se utilizan en terapias médicas folclóricas comunes, y el consumo de carne no es extendido. Hasta la década de 1980s ejemplares adultos de *Leptodactylus latrans* eran colectados en zonas suburbanas y rurales inmediatas a Montevideo en pequeña escala, para abastecer un limitado mercado local de carne de rana para consumo humano (G. Dewailly, com. pers.). En la misma década la Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*) es introducida para su cultivo con fines comerciales (Amestoy *et al.* 1998) y una parte de la producción comenzó a abastecer el mercado local. Varias granjas productoras de Rana toro se establecieron en distintas zonas del país pero la industria colapsó a principios de los años 2000s (ver Capítulo 5), y el mercado local de ancas de rana no fue sustituido con *L. latrans* del medio silvestre. El consumo de esta última especie por la población es actualmente excepcional.



## Referencias

- Amestoy, F., Spinetti, M. & Fabiano, G. (1998) Aquatic species introduced in Uruguay. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 26, 2170–2173.
- Berger, L., Skerratt, L.F., Zhu, X.Q., Young, S. & Speare, R. (2009) Severe sparganosis in Australian Tree frogs. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(4), 921–929.
- Bezerra, C.H., Braga, R. da R., Borges-Nojosa, D.M. & Silva, G.A. (2012) Occurrence of spargana infection in *Dermatonotus muelleri* Boettger, 1885 (Anura, Microhylidae) from a coastal complex in northeastern Brazil. *Herpetology Notes*, 5, 69–71.
- Bowman, D.D., Hendrix, C.M., Lindsay, D.S. & Barr, S.C. (2002) *Feline clinical parasitology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 469 p.
- Chi, J.G., Chi, H.S. & Lee, S.H. (1980) Histopathologic study on human sparganosis. *The Korean Journal of Parasitology*, 18(1), 15–23.
- Crampet, A., Castro, O. & Venzal, J.M. (2008) Contribución al conocimiento de los helmintos del “lagarto overo”, *Tupinambis merianae*, en Uruguay. IX Jornadas de Zoología del Uruguay (10–13 diciembre, Montevideo), p. 101.
- Cui, J., Lin, X.M., Zhang, H.W., Xu, B.L. & Wang, Z.Q. (2011) Sparganosis, Henan Province, central China. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 146–147.
- Dei-Cas, E., Roriguez, N., Botto, C. & Osimani, J.J. (1976) Larvas plerocercoides de *Spirometra* (Dibothriocephalidae) en el hombre y en animales silvestres de Uruguay. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 18(3), 165–172.
- Gomez-Puerta, L.A., Chávez, G., Enciso, M.A. & Mendoza, A.P. (2010) Infestación por esparganos en ranas del genero *Pristimantis* (Anura, Strabomantidae) del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 17(2), 265–266.
- Hou, X., McManus, D.P., Lou, Z. Chen, S. & Li, Y. (2012) Differentiation and diagnosis of migrating cerebral sparganosis: 2 case reports from China. *Case Reports in Clinical Medicine*, 1, 13–18.
- Kuchta, R., Scholz, T. & Bray, R.A. (2008) Revision of the order Bothriocephalidea Kuchta, Scholz, Brabec & Bray, 2008 (Eucestoda) with amended generic diagnoses and keys to families and genera. *Systematic Parasitology*, 1(2), 81–136.
- Mueller, J.F. (1974) The biology of *Spirometra*. *Journal of Parasitology*, 61, 774–775.
- Osimani, J.J. & Peyrallo, R. (1954) Segundo caso de esparganosis encontrado en América del Sur. Primer caso descrito en el Uruguay. *Archivos Uruguayos de Medicina y Cirugía Especializada*, 44, 139–147.
- Poulin, R. (2013) Explaining variability in parasite aggregation levels among host samples. *Parasitology*, 140(4), 541–546.
- Rego, A.A. & Schäffer, G.V. (1992) *Sparganum* in some Brazilian vertebrates. Problems in the identification of species of *Luheella* (*Spirometra*). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87(Suppl. 1), 213–216.
- Sakamoto, T., Gutiérrez, C., Rodríguez, A. & Sauto, S. (2003) Testicular sparganosis in a child from Uruguay. *Acta Tropica*, 88(1), 83–86.
- Sampaio, I., Castro, E. & Zunini, C. (1987) Primer hallazgo de *Spirometra* sp. en *Felis catus domesticus* en Uruguay. *Revista de la Sociedad Uruguaya de Parasitología*, 1(1): 15–20.

- Venturini, L. (1989) El ciclo evolutivo experimental de *Ddiphyllobotrium erinaceieuropei* en *Paracyclops fimbriatus*, larvas de *Bufo arenarum* y caninos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 31(5), 308–312.
- Vogelsang, E.G. (1925) La presencia de *sparganum* en las ranas (*Leptodactylus ocellatus*) del Uruguay. *Revista de Medicina Veterinaria*, 2, 301.
- Wolffhügel, K. & Vogelsang, E. (1926) *Dibothriocephalus decipiens* (Diesing) y su larva *Sparganum reptans* en el Uruguay. *Revista de Medicina Veterinaria*, 2, 433–434.



## Neoplasias

### Resumen

Las neoplasias espontáneas en poblaciones silvestres de anfibios son infrecuentes y poco se conoce de su biología. En este Capítulo se reporta la ocurrencia de tumoraciones neoplásicas en los anuros *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) y *Melanophryniscus sanmartini* (Bufonidae) del centro-sur de Uruguay. En el primer caso se trató de dos ejemplares con pequeños tumores pigmentados y encapsulados encontrados en el tejido subcutáneo, que histológicamente correspondieron a melanoforomas. En un ejemplar de *M. sanmartini* una tumoración dorsal subcutánea correspondió a un lipoma. Se discute la relevancia de estos hallazgos, principalmente en relación a las posibles causas de aparición de melanoforomas en anfibios.

## **Introducción**

Los reportes sobre enfermedades neoplásicas de los anfibios son raros, y muy escasos en relación a otros grupos de vertebrados (Balls & Clothier 1974; Asashima *et al.* 1987; Stacy & Parker 2004). Sin embargo se conocen numerosos tipos de neoplasias tanto benignas como malignas, identificadas en especies pertenecientes a muy diversos grupos taxonómicos (Schlumberger & Lucké 1948; Schlumberger 1957; Balls 1962; Balls & Clothier 1974; Harshbarger 1977). Los estudios sobre tumores de piel en anfibios constituyen gran parte de los estudios disponibles sobre el tema (Balls & Clothier 1974; Asashima *et al.* 1987). La piel y el tejido subcutáneo pueden verse afectados por varios tipos de proliferación neoplásica como papilomas, adenomas, adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas, lipomas, melanoforomas y tumores mesenquimales (Schlumberger & Lucké 1948; Balls 1962; Berger *et al.* 2004). Los tumores espontáneos de anfibios en su medio natural son poco frecuentes, salvo por el adenocarcinoma renal o tumor de Lucké en *Lithobates pipiens* aparentemente inducido por virus (Schlumberger & Lucké 1948), y tumores de células pigmentarias de la piel (melanoforomas) asociados a contaminación ambiental (Rose & Harshbarger 1977; Green & Harshbarger 2001). En este Capítulo se comunica el hallazgo de neoplasias espontáneas en poblaciones de anfibios silvestres de Uruguay.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Reportar el hallazgo de neoplasias espontáneas en poblaciones silvestres de anfibios nativos de Uruguay.

### **Objetivos específicos**

- 1) Describir las lesiones macro y microscópicas de las neoplasias.
- 2) Discutir su importancia desde un punto de vista epidemiológico.

## **Materiales y métodos**

### **Sitios de estudio, especímenes y procedimientos**

Los muestreos se realizaron en los alrededores de La Paloma y Laguna de Rocha (34°38' S, 54°12' W), Dpto. de Rocha, y en Valentines, Dpto. de Treinta y Tres (33°15' S, 55°06' W), como parte de los estudios que se describen en el Capítulo 8. En los alrededores de La Paloma y Laguna de Rocha se capturaron 139 ejemplares adultos de *Hypsiboas pulchellus* entre agosto de 2011 y abril de 2014. Dos de estos ejemplares presentaron tumoraciones cutáneas de coloración oscura que fueron analizadas.

En Valentines se colectaron dos ejemplares adultos de *Melanophryniscus sanmartini* (Anura, Bufonidae), el 5 de julio de 2009, en pequeños cuerpos de agua temporales. Ambos se encontraban vocalizando en sitios utilizados para la reproducción. Uno de ellos presentó una tumoración dorsal estudiada en esta sección. Los especímenes fueron fotografiados y se practicó un examen post-mortem para observar la presencia de lesiones internas, y se realizaron cortes histológicos de las lesiones. Los procedimientos se describen en el Capítulo 2. Especímenes adicionales colectados en los sitios de estudio fueron examinados externamente, la lista se muestra en el Apéndice 2.

## **Resultados**

### **Tumores de piel pigmentados en *Hypsiboas pulchellus***

La coloración normal de la piel y tejido subcutáneo en *Hypsiboas pulchellus* en la región ventral es blanquecino o crema, a excepción del saco vocal en los machos adultos que presenta una coloración amarillenta. En dos ejemplares se detectaron zonas circunscriptas de la piel ventral con una coloración oscura atípica (1,4%). Ambos estaban en apariencia sanos y se colectaron mientras vocalizaban en un cuerpo de agua utilizado por la especie para la reproducción (ver figura 7.2 A del Capítulo 7). Uno de ellos, macho adulto (MNHN 9508) de 34,6 mm LHC, presentaba un nódulo de color oscuro de aproximadamente 1,5 mm de eje mayor claramente visible en la región posterior de la piel del abdomen. El otro individuo fue

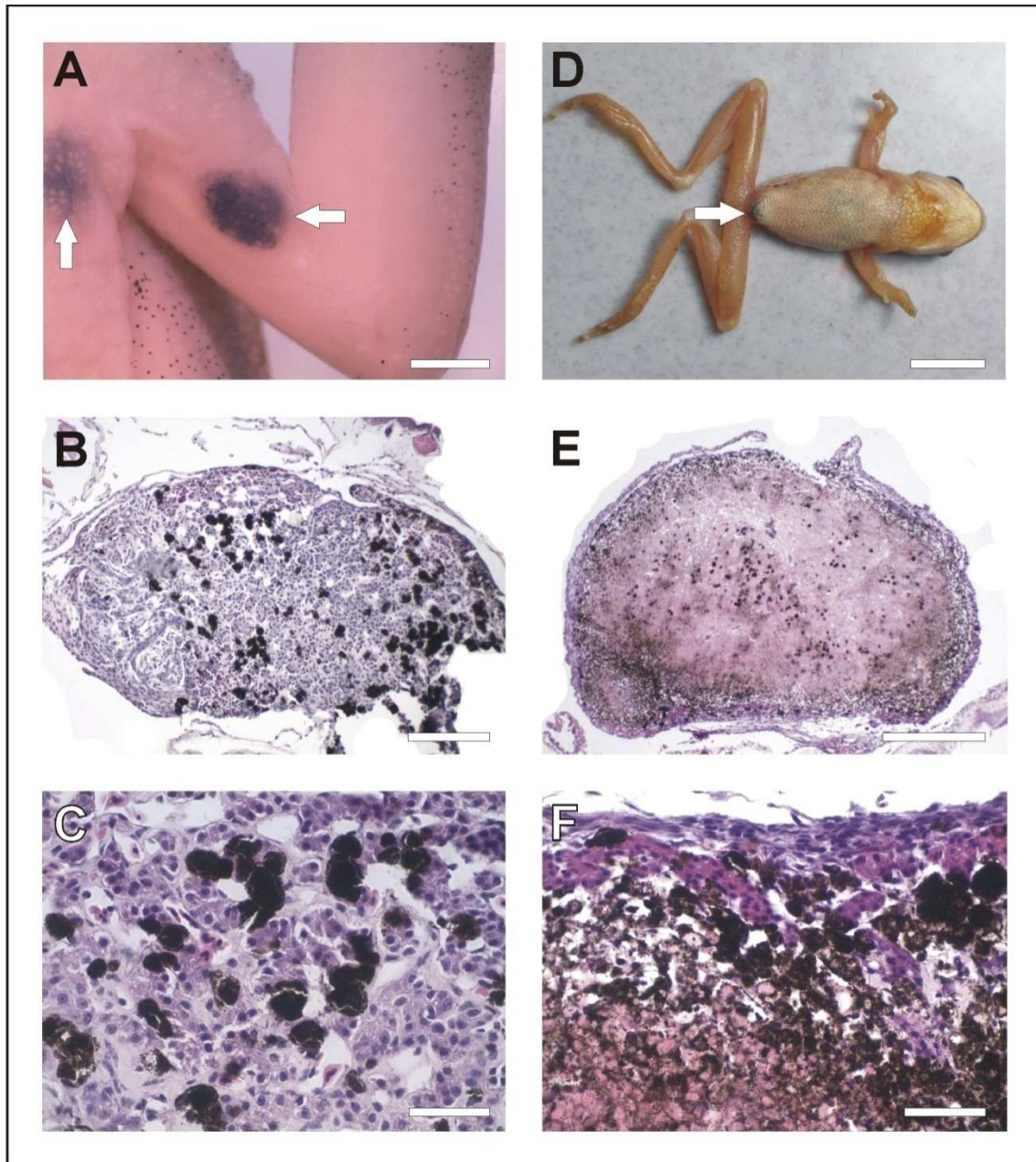
también un macho adulto (MNHN 9509) de 31,6 mm LHC, que presentaba dos pequeñas manchas oscuras de aproximadamente 1 mm de eje mayor en el tejido subcutáneo del brazo y región axilar izquierdos. A la necropsia no se observaron alteraciones patológicas macroscópicas en órganos internos o metástasis en ninguno de los ejemplares.

Al corte histológico se observó en ambos casos que se trataba de proliferaciones neoplásicas de similares características, pigmentadas, localizadas en el tejido subcutáneo, con una fina cápsula formada por unas pocas capas de células aplanadas. En el caso del ejemplar MNHN 9508 se observó por debajo de la cápsula una fina capa de cordones celulares dispuestos irregularmente, y el resto del tumor correspondió a una gran masa de tejido necrótico eosinófilo. Los cordones celulares estaban formados por células de núcleos bien prominentes que ocupaban gran parte del citoplasma, más eosinófilas que en MNHN 9509. En este último ejemplar el tumor no presentó tejido necrótico en su centro, y estuvo formado por cordones celulares similares dispuestos irregularmente. La característica más notable de ambos tumores fue la presencia de abundante pigmento oscuro entre los cordones celulares y tejido necrótico, asimilable a un acúmulo de melanina, lo que sugiere se trataría en ambos casos de melanoforomas pigmentados. Las células son en general fusiformes, hay células multinucleadas y son notorias algunas proyecciones citoplasmáticas. Las figuras de mitosis son raras. Imágenes macro y microscópicas de las lesiones se muestran en la figura 10.1.

### **Tumor subcutáneo en *Melanophryniscus sanmartini***

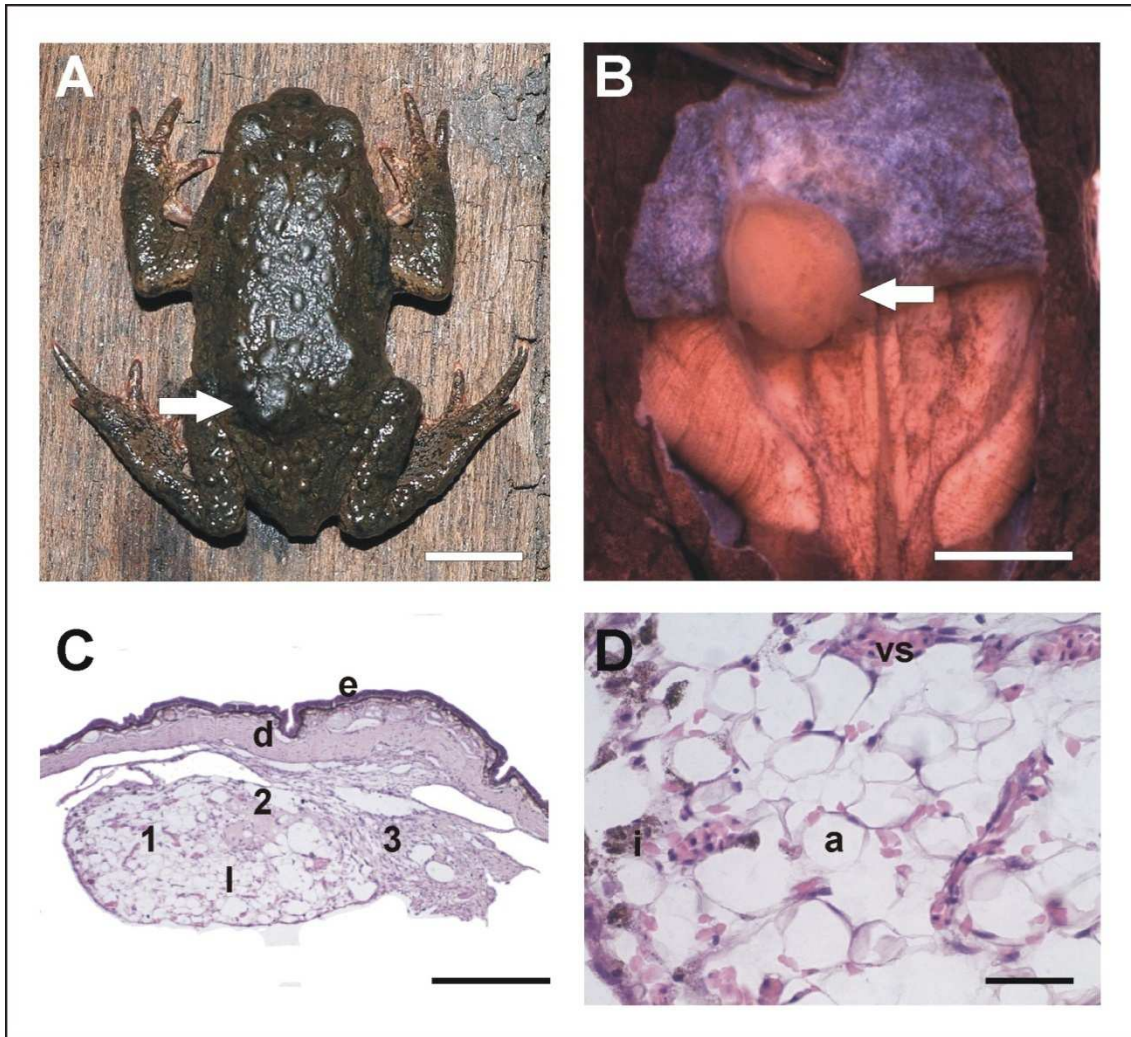
El ejemplar de *Melanophryniscus sanmartini* (MNHN 9510 macho adulto, 23,4 mm de LHC) presentó una tumoración en la región lumbar, de aproximadamente 3 mm de diámetro, figura 10.2 A. La tumoración se presentó firme al tacto, y al disecar la piel se observó una formación amarillenta, redondeada de aproximadamente 0,5 mm de diámetro, con una muy fina cápsula laxamente adherida a la piel y tejido muscular subyacente, figura 10.2 B. Al corte histológico se observaron 3 zonas más o menos diferenciadas: 1) la mayor parte del tumor consistió en una región donde predominan células adiposas típicas (adipocitos); 2) una zona donde los adipocitos son más pequeños y aplanados, alternando con células de tipo fibroso, en la unión con la dermis; 3) una región fibrosa libre de adipocitos, donde posiblemente se originó el tumor; ver figura 10.2 C. Los adipocitos de la zona 1 presentaron el núcleo excéntrico, y estaban dispuestos sin una organización definida, con evidente vascularización, figura 10.2 D. No se observó invasión de tejido lipomatoso en la dermis o en los músculos dorsales

subyacentes. Las características macro y microscópicas del tumor hallado en el ejemplar MNHN 9510 corresponden a la de un lipoma.



**FIGURA 10.1.** Melanoforomas en *Hysiboas pulchellus*. B-F, cortes histológicos con tinción H&E. **A**, ejemplar MNHN 9509, presenta dos tumores pigmentados en axila y brazo (flechas). Barra = 1 mm. **B**, vista panorámica del tumor del brazo. Barra = 200  $\mu$ m. **C**, mismo tumor con mayor magnificación. Barra = 100  $\mu$ m. **D**, ejemplar MNHN 9508 en vista ventral, la flecha señala un tumor pigmentado en la parte posterior del abdomen. Barra = 10 mm. **E**, tumor del mismo ejemplar en vista panorámica. Barra = 500  $\mu$ m. **F**, vista con mayor magnificación. Barra = 500  $\mu$ m.





**FIGURA 10.2.** Lipoma subcutáneo en *Melanophryniscus sanmartini* MNHN 9510. **A**, vista dorsal del ejemplar en vida bajo anestesia, se aprecia una tumoración dorsal en zona lumbar (flecha). Barra = 5 mm. **B**, disección de la tumoración con exposición del lipoma (flecha). Barra = 2 mm. **C**, corte histológico transversal del tumor con piel adyacente (zonas 1, 2 y 3, ver texto). Barra = 500  $\mu$ m. **D**, vista a mayor aumento de adipocitos, junto con vasos sanguíneos e iridóforos. Barra = 50  $\mu$ m. Abreviaturas: a, adipocitos; d, dermis; e, epidermis; l, lipoma.

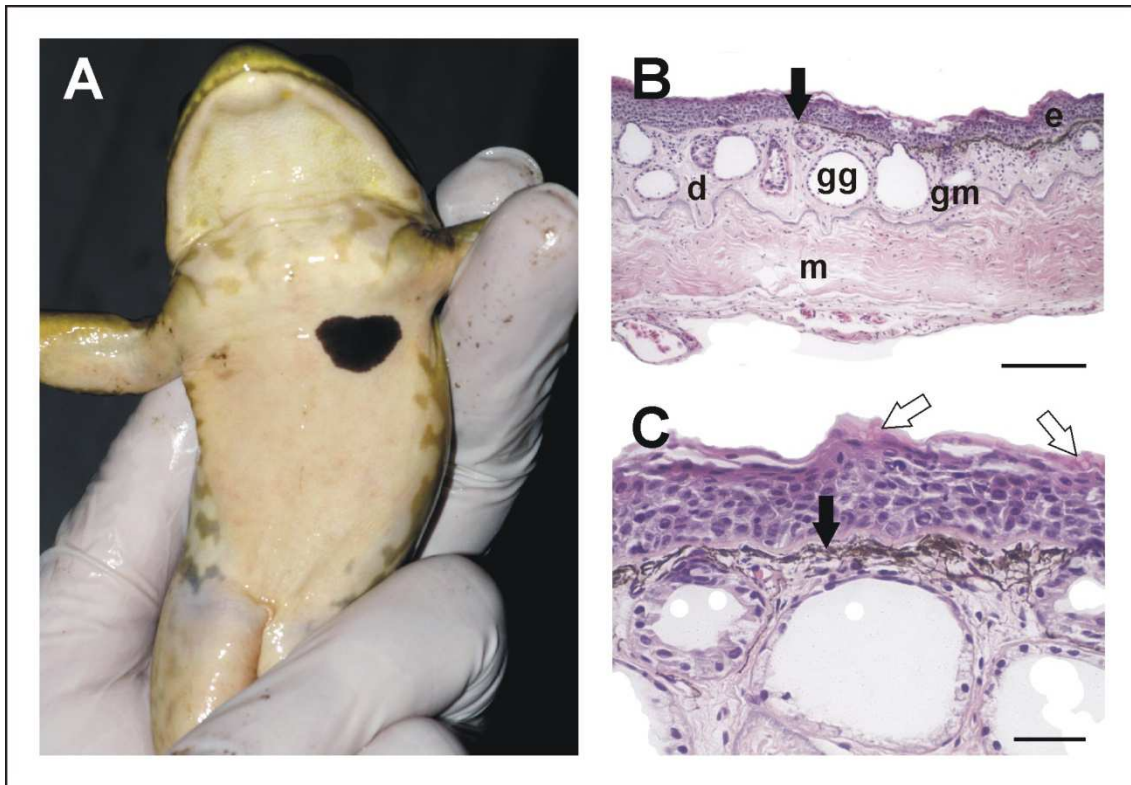
## Discusión

### Melanoforomas en *Hypsiboas pulchellus*

Los melanoforomas espontáneos no son comunes en anfibios, y se han registrado en unas pocas especies, los urodelos *Ambystoma mexicanum* (Krontovsky 1916, en Schlumberger & Lucké 1948; Sheremetieva-Brunst & Brunst 1948, en Schlumberger & Lucké 1948; Sheremetieva 1965; Khudoley & Eliseiv 1979), *Ambystoma tigrinum* (Rose & Harshbarger 1977), *Calotriton arnoldi* (Martínez-Silvestre *et al.* 2011) y *Triturus cristatus* (Leone & Zavanella 1969; Green & Harshbarger 2001), y los anuros *Trachycephalus typhonius* (Green & Harshbarger 2001), *Rana temporaria* (Rostand 1958, en Balls & Clothier 1974) y *Xenopus laevis* (Elkan 1963). Generalmente este tipo de neoplasias se encuentran en baja frecuencia en la naturaleza salvo por dos casos descritos en poblaciones de *A. tigrinum* y *T. cristatus* en los que los tumores se asociaron a contaminación ambiental (Rose & Harshbarger 1977; Green & Harshbarger 2001).

En sus etapas iniciales los melanoforomas pueden confundirse con la hiperplasia de melanóforos secundaria a dermatitis que se presenta como manchas cutáneas de tipo no nodular (Stacy & Parker 2004), condición que puede presentarse en granulomas infecciosos (Miller *et al.* 2009). Estas condiciones no neoplásicas se manifiestan como manchas oscuras en la piel que pueden apreciarse como se muestra en la figura 10.3; dicho caso corresponde a un ejemplar silvestre de la Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*), en el que la mancha oscura consiste en un acúmulo de melanina en la capa más superficial de la dermis.

Los melanoforomas en anfibios pueden ser solitarios o multicéntricos, con cantidades variables de pigmentación, ser no palpables o nodulares, y pueden regresar o bien comportarse como tumores cancerosos muy malignos capaces de producir múltiples metástasis a distancia (Reichenbach-Klinke & Elkan 1965; Leone & Zavanella 1969; Stacy & Parker 2004). Green y Harshbarger (2001) realizan una revisión de la literatura y de nuevos casos registrados en el *Registry of Tumors in Lower Animals* (RTLA, Virginia, USA). Encuentran que en anfibios los melanoforomas pueden localizarse en distintas regiones de la piel y los clasifican en dos tipos, benignos (dendríticos, fibromatosos) y malignos (epitelioides, malignos). Los tumores aquí descritos parecen corresponder al tipo dendrítico benigno ya que son pequeños, oscuros, protruyen escasamente sobre la superficie de la epidermis, tienen una fina cápsula y algunas células presentan proyecciones citoplasmáticas.



**FIGURA 10.3.** Hiperpigmentación anómala no neoplásica en un ejemplar subadulto de *Rana toro* norteamericana (*Lithobates catesbeianus*), Aceguá, Dpto. de Cerro Largo, Uruguay (25/V/2012). **A**, vista ventral del ejemplar, se observa una zona pigmentada en la región pectoral izquierda. **B**, corte histológico de la zona indicada en **A**, aparece una delgada capa pigmentada bajo la epidermis, la flecha indica el límite de la misma, tinción H&E. **C**, zona pigmentada a mayor aumento (flecha negra), tinción H&E. En la epidermis se observan esporangios vacíos de *Batrachochytrium dendrobatidis* (flechas blancas). Barras = 100  $\mu$ m. Abreviaturas: d, dermis; e, epidermis; gg, glándula granular, gm, glándula mucosa; m, músculo.

Las posibles causas indicadas para los melanoforomas en anfibios son variadas. En el caso de *Ambystoma tigrinum* las altas frecuencias de melanoforomas espontáneos observada en una población en Texas (hasta 53%) se asoció a polución, pudiendo los tumores regresar cuando los animales eran transferidos a un ambiente más saludable (Rose & Harshbarger 1977). Observaciones similares se realizaron en *Triturus cristatus* (Green & Harshbarger 2001). Por otra parte en una colonia en cautiverio de *A. mexicanum* en Alemania se observó una aparente predisposición genética a la formación de estos tumores, pero ésta se perdió durante la segunda guerra mundial (Sheremetieva-Brunst & Brunst, *vide* Schlumberger & Lucké 1948; Green & Harshbarger 2001). Por último, en melanoforomas de *Xenopus laevis* se han encontrado partículas virales dentro de las células tumorales aunque no se pudo establecer que sean la causa de los tumores (Oinuma *et al.* 1984; Asashima *et al.* 1989). En esta especie

la incidencia de melanoforomas espontáneos reportada por Asashima *et al.* (1989) fue 1:5000, mucho más baja que la observada en *Hypsiboas pulchellus* (1:139).

En los casos de melanoforomas en *Hypsiboas pulchellus* aquí descritos no se pudo investigar la presencia de partículas virales en los tumores o la evolución de los mismos debido a las pocas muestras disponibles. Otra de las posibles causas de la aparición de melanomas en humanos es la exposición a radiación UV (Chang *et al.* 2009). Sin embargo, en *H. pulchellus* los tumores se encontraron en zonas ventrales no expuestas directamente a la radiación solar y además esta especie tiene hábitos predominantemente nocturnos. Sería deseable evaluar en futuros estudios la posible influencia de otros factores ambientales como la temperatura, ya que ambos ejemplares afectados se colectaron en primavera (9 de noviembre de 2013) en una muestra de 32 individuos (6,3 %). Se ha observado por ejemplo que en *Triturus cristatus* el crecimiento de los melanoforomas depende de la temperatura ambiente (Zavanella 1985).

### **Lipoma en *Melanophryniscus sanmartini***

Los lipomas típicos son tumores mesenquimales de tejidos blandos de crecimiento lento, y las neoplasias de tejidos blandos más comunes en el hombre, usualmente con un comportamiento benigno (Mentzel & Fletcher 1995). En animales silvestres su hallazgo es raro (Schlumberger & Lucké 1948; Effron *et al.* 1977; Garner *et al.* 2004). En anfibios solamente existe información en la literatura sobre dos casos de lipomas, Reichenbach-Klinke y Elkan (1965) reportan un tumor lipomatoso en *Bufo bufo* (Bufonidae) que ocupaba el divertículo urinario derecho. El otro caso es el descrito por Balls (1962) quien encuentra un lipoma subcutáneo de unos 2 cm en el dorso de un ejemplar hembra adulto de *Xenopus laevis* proveniente de Ciudad del Cabo. El tumor se localizaba en el tejido subcutáneo, estaba, pobremente vascularizado y unido al cuerpo graso derecho a través de los músculos lumbares. El lipoma hallado en *Melanophryniscus sanmartini* tiene la estructura de un tumor benigno. Su localización y tamaño al momento de su estudio posiblemente no causaran mayores perjuicios al ejemplar.

## Referencias

- Asashima, M., Oinuma, T. & Meyer-Rochow, V.B. (1987) Tumors in Amphibia. *Zoological Science*, 4, 411–425.
- Asashima, M., Oinuma, T. & Komazaki, S. (1989) Electron microscopical and histochemical studies of the spontaneous tumors of *Xenopus laevis*. *Zoological Science*, 6, 899–905.
- Balls, M. (1962) Spontaneous neoplasms in Amphibia: a review and descriptions of six new cases. *Cancer Research*, 22, 1142–1154.
- Balls, M. & Clothier, R.H. (1974) Spontaneous tumors in Amphibia. *Oncology*, 29, 501–519.
- Berger, L., Speare, R. & Middleton, D. (2004) A squamous cell carcinoma and an adenocarcinoma in Australian treefrogs. *Australian Veterinary Journal*, 82(1–2), 96–98.
- Chang, Y., Barrett, J.H., Bishop, D.T., Armstrong, B.K., Bataille, V., Bergman, W., Berwick, M., Bracci, P.M., Elwood, J.M., Ernstoff, M.S., Gallagher, R.P., Green, A.C., Gruis, N.A., Holly, E.A., Ingvar, C., Kanetsky, P.A., Karagas, M.R., Lee, T.K., Marchand, L.L., Mackie, R.M., Olsson, H., Østerlind, A., Rebbeck, T.R., Sasieni, P., Siskind, V., Swerdlow, A.J., Titus-Ernstoff, L., Zens, M.S. & Newton-Bishop, J.A. (2009) Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *International Journal of Epidemiology*, 38, 814–830.
- Effron, M., Griner, L. & Benirschke, K. (1977) Nature and rate of neoplasia found in captive wild mammals, birds, and reptiles at necropsy. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1), 185–198.
- Elkan, E. (1963) Three different types of tumors in Salientia. *Cancer Research*, 23, 1641–1645.
- Garner, M.M., Hernandez-Divers, S. & Raymond, J.T. (2004) Reptile neoplasia: a retrospective study of case submissions to a specialty diagnostic service. *Veterinary Clinics of North America, Exotic Animal Practice*, 7, 653–671.
- Green, D.E. & Harshbarger, J.C. (2001) Chapter 26. Spontaneous neoplasia in Amphibia. En: Wright, K.M. & Whitaker, B.R. (eds.), *Amphibian medicine and captive husbandry*, Krieger Publishing Co., Malabar, Florida, pp. 335–400.
- Harshbarger, J.C. (1977) Role of the Registry of Tumors in Lower Animals in the study of environmental carcinogenesis in aquatic animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 298, 280–289.
- Khudoley, V.V. & Eliseiv, V.V. (1979) Multiple melanomas in the Axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Journal of the National Cancer Institute*, 63(1), 101–103.
- Leone, V.G. & Zavanella, T. (1969) Some morphological and biological characteristics of a tumor of the newt, *Triturus cristatus* Laur. En: Mizell, M. (ed.), *Biology of Amphibian Tumors*, Springer-Verlag, New York, pp. 184–194.
- Martínez-Silvestre, A., Amat, F., Bargallo, F. & Carranza, S. (2011) Incidence of pigmented skin tumors in a population of wild Montseny Brook Newt (*Calotriton arnoldi*). *Journal of Wildlife Diseases*, 47(2), 410–414.
- Mentzel, T. & Fletcher, C.D.M. (1995) Lipomatous tumours of soft tissues: an update. *Virchows Archiv*, 427(4), 353–363.
- Miller, D.L., Gray, M.J., Rajeev, S., Schmutzer, A.C., Burton, E.C., Merrill, A. & Baldwin, C.A. (2009) Pathologic findings in larval and juvenile anurans inhabiting farm ponds in Tennessee,

- USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(2), 314–324.
- Oinuma, T., Seki, M. & Asashima, M. (1984) Histological and electron microscopical studies on neoplasia subcutaneously occurring in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the Japan Academy*, 60 B (7), 265–268.
- Reichenbach-Klinke, H. & Elkan, E. (1965) *The principal diseases of lower vertebrates*. Academic Press, London & New York, 600 p.
- Rose, F.L. & Harshbarger, J.C. (1977) Neoplastic and possibly related skin lesions in neotenic Tiger salamanders from a sewage lagoon. *Science*, 197(4287), 315–317.
- Schlumberger, H.H. (1957) Tumors characteristic for certain animal species: a review. *Cancer Research*, 17(9), 823–832.
- Schlumberger, H.H. & Lucké, B. (1948) Tumors of fishes, amphibians and reptiles. *Cancer Research*, 8(12), 657–754.
- Sheremetieva, E.A. (1965) Spontaneous melanoma in regenerating tails of Axolotls. *Journal of Experimental Zoology*, 158(1), 101–121.
- Stacy, B.A. & Parker, J.M. (2004) Amphibian oncology. *Veterinary Clinics of North America (Exotic Animal Practice)*, 7, 673–695.
- Zavanella, T. (1985) Environmental temperature and metastatic spread of melanoma in the crested newt. *Cancer Letters*, 27(2), 171–179.



## Trombidiasis

### Resumen

En esta sección se presenta el hallazgo de parasitosis por larvas de ácaros (Trombiculidae, Acarina) en anfibios nativos. La parasitosis se observó en los anuros hílidos *Hypsiboas pulchellus*, *Scinax squalirostris* y el leptodactílido *Leptodactylus latrans*. Las larvas, de un color naranja vivo, se encontraron enquistadas en la dermis, con preferencia por regiones ventrales de abdomen y miembros posteriores. Estos hallazgos son los primeros en anfibios de Uruguay, y las características de la parasitosis es similar a lo reportado previamente para anfibios.



## Introducción

Varios grupos de artrópodos parásitos pueden encontrarse en la piel en vertebrados terrestres, entre ellos los ácaros (Arachnida, Acarina). La parasitosis cutánea por ácaros o acariasis se debe principalmente a las garrapatas (Ixodidae) y los comúnmente llamados “bichos colorados” (Trombiculidae). Estos últimos son de hallazgo relativamente común como parásitos de anfibios (Duellman & Trueb 1986). Numerosas especies hospedadoras han sido reportadas en este grupo de vertebrados en el nuevo mundo, tanto en Norteamérica como Sudamérica (Ewing 1931; Jung *et al.* 2001; Hatano *et al.* 2007; Torrence *et al.* 2007; Westfall *et al.* 2008; Attademo *et al.* 2012). Las formas inmaduras o larvas usualmente penetran la piel de los anfibios, donde se desarrollan y maduran (Hyland 1950; Mendez *et al.* 2010). Las regiones dorsales son más afectadas que las ventrales y en reacción a la presencia de los parásitos el hospedador produce una delgada cápsula fibrosa (Duszynski & Jones 1973). Las larvas parásitas en íntimo contacto con las capas profundas de la piel de sus hospedadores se alimentan de linfa y las ninfas y adultos son saprófitos de vida libre (Ewing 1926; Shatrov 2000). En Uruguay la acariasis ha sido observada en diversos grupos de vertebrados terrestres, excepto los anfibios (Castro & Trenchi 1955; Venzal *et al.* 2003). En esta sección se reportan los primeros casos de acariasis por larvas de Trombiculidae en especies de anfibios nativas de Uruguay.

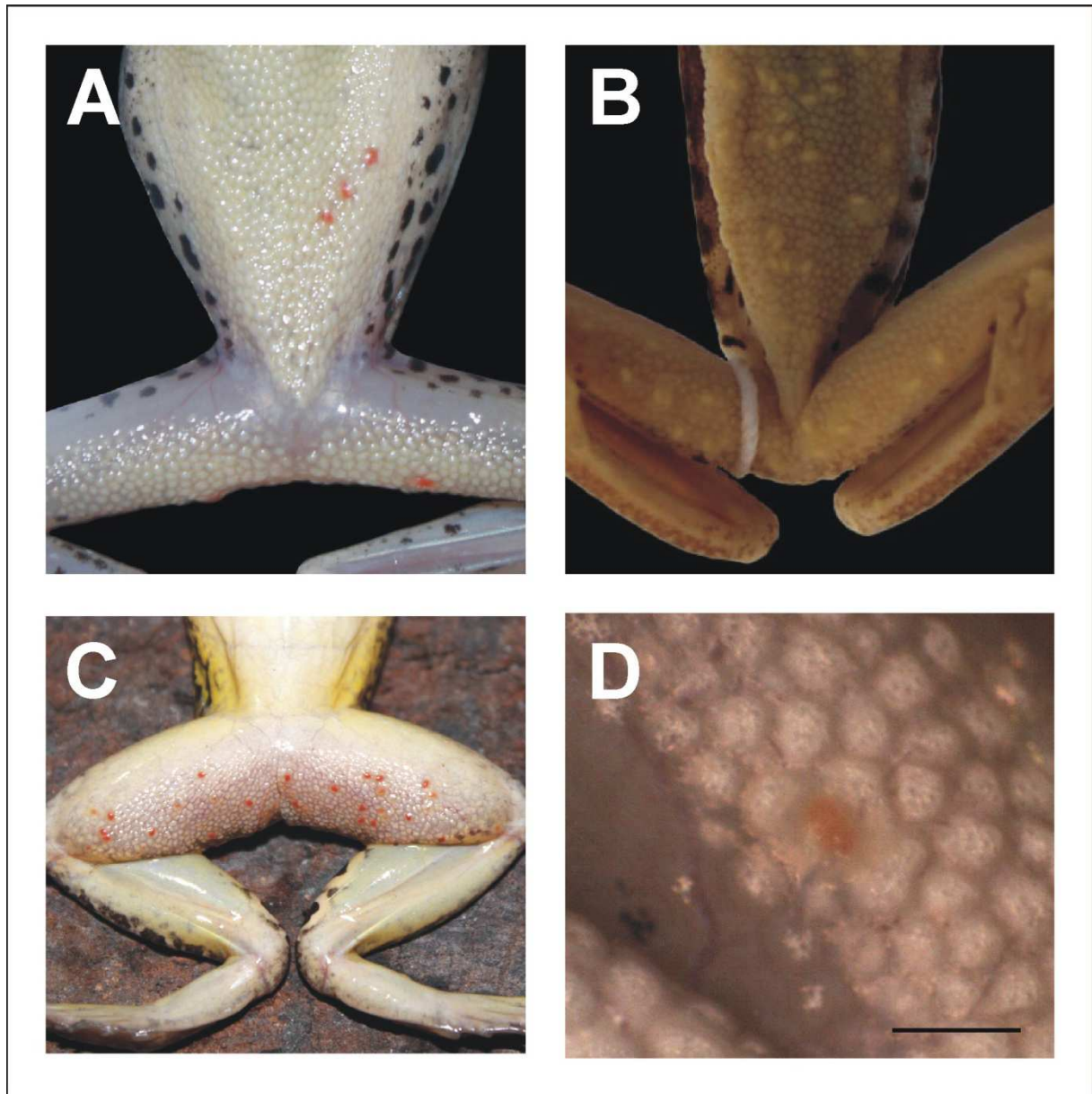
## Materiales y Métodos

Los ejemplares de anfibios estudiados, acrónimos y procedimientos de laboratorio se corresponden con lo detallado en capítulos anteriores.

## Resultados

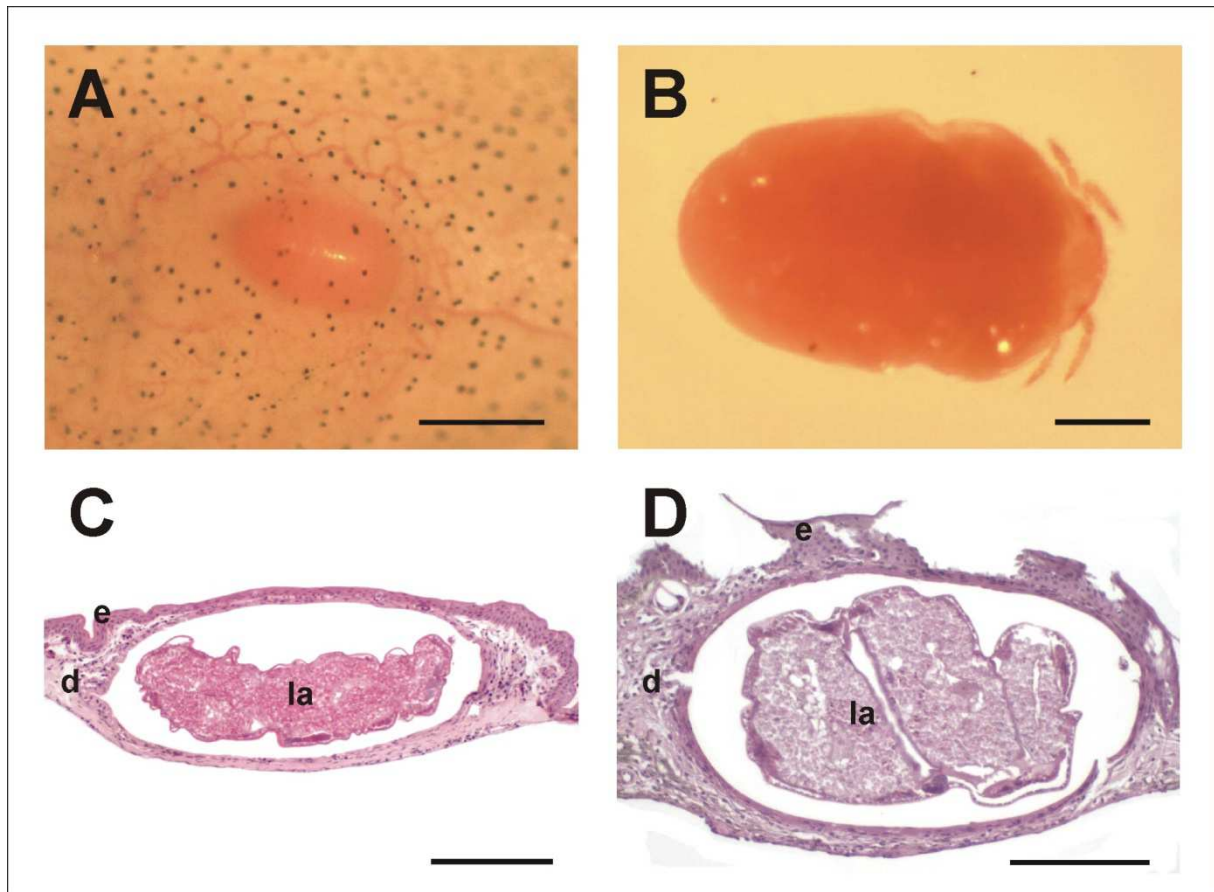
Durante los muestreos de campo realizados en este estudio la parasitosis por larvas de ácaros trombicúlidos se detectó en ejemplares adultos de anfibios anuros correspondientes a las especies de hílidos *Hypsiboas pulchellus*, *Scinax squalirostris* y *Scinax granulatus*, y el leptodactílido *Leptodactylus latrans*. Los nódulos parasitarios debido a las larvas enquistadas bajo la piel se observaron en todos los ejemplares en zonas ventrales de miembros y abdomen,

figura 11.1 A-C. Esta parasitosis fue fácilmente identificable ya que las larvas presentan un color naranja vivo, figura 11.2 A, B. En ejemplares fijados éstas adquieren un color crema, similar al de lesiones causadas por agentes infecciosos, figura 11.1 B.



**FIGURA 11.1.** Trombidiasis en *Hysiboas pulchellus* y *Leptodactylus latrans*. **A**, *Hysiboas pulchellus*, ejemplar adulto MNHN 9525, Laguna de Rocha, Dpto. de Rocha, Uruguay (17/VIII/2013), *in vivo*. Presenta varios nódulos parasitarios en piel ventral de miembros y abdomen. **B**, *Hysiboas pulchellus*, ejemplar adulto MNHN 4526, São Gabriel, estado de Rio Grande do Sul, Brasil (10/I/1962), fijado. Se observan múltiples nódulos parasitarios color crema. **C**, *Leptodactylus latrans*, ejemplar adulto MNHN 9526, La Paloma, Dpto. de Rocha (5/II/2014); presenta numerosos quistes parasitarios en parche pélvico y miembros posteriores. **D**, *Hysiboas pulchellus*, ejemplar adulto MNHN 9527 quiste a mayor aumento, Laguna de Rocha (5/II/2014). Barra = 1 mm.

Al corte histológico las larvas de ácaros se presentan incluidas en una cápsula, con varias capas de células aplanadas que presentan el aspecto de un epitelio queratinizado, con una compactación de la dermis y fibroblastos periféricos, figura 11.2 C, D.



**FIGURA 11.2.** Trombicidiasis en *Scinax squalirostris*, *Scinax granulatus* e *Hypsiboas pulchellus*. **A**, *Scinax squalirostris* MNHN 9528, La Paloma, Dpto. de Rocha (2/VIII/2013), *in vivo*. Se observa una larva de ácaro enquistada en la piel ventral de un miembro posterior, con aparente neoformación de vasos alrededor del quiste. Barra = 0,5 mm. **B**, imagen de la misma larva de **A**. Barra = 100 μm. **C**, *Scinax granulatus* MNHN 9529, Bañado de los Oliveras, Dpto. de Treinta y Tres (22/I/2006), corte histológico de quiste parasitario en piel abdominal, tinción H&E. Barra = 200 μm. **D**, *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9525, Laguna de Rocha, Dpto. de Rocha (17/VIII/2013), corte histológico de quiste parasitario en piel abdominal, tinción H&E. Barra = 200 μm.

## Discusión

En la región el parasitismo por ácaros trombicúlidos en anfibios fue previamente reportado en *Leptodactylus chaquensis* y *L. latrans* de Argentina (Attademo *et al.* 2012). Si bien estos parásitos son ubicuos, los reportes en anfibios neotropicales son muy escasos y las especies involucradas han sido asignadas al género *Hannemania* (Wholtmann *et al.* 2006; Hatano *et al.* 2007; Attademo *et al.* 2012). En los anfibios aquí estudiadas la distribución de las lesiones presentó un patrón similar, y los hallazgos macroscópicos e histológicos fueron también semejantes. Si bien la muestra es pequeña, cuatro de los cinco ejemplares de *Hypsiboas pulchellus* parasitados fueron colectados en el verano, lo cual puede estar relacionado con cambios en el comportamiento del hospedador que facilita la ocurrencia de la parasitosis. *Hypsiboas pulchellus* presenta poca actividad durante los meses más cálidos lo cual podría facilitar el encuentro con los parásitos. La incidencia de la parasitosis puede ser mayor en ambientes modificados por el hombre, por ejemplo zonas de cultivos, como se observó para *L. chaquensis* en Argentina (Attademo *et al.* 2012).

La patología de las lesiones observadas es coincidente con lo descrito para otras especies de anfibios, en los que las larvas aparecen enquistadas bajo la piel (Mendez *et al.* 2010; Sladky *et al.* 2000). Una excepción es el reporte de Torrence *et al.* (2007) quienes encuentran larvas de Trombiculidae (*Hannemania* sp.) sobre la superficie de la piel, sin la formación de quistes, así como tampoco cambios patológicos en la dermis.

En nuestro país, más estudios son necesarios para conocer la incidencia de esta parasitosis en especies con requerimientos ecológicos diferentes, y la influencia de modificaciones ambientales en la relación hospedador-parásito.

## Referencias

- Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Junges, C., Bassó, A. & Cabagna-Zenkhusen, M. (2012) Trombiculid mites (*Hannemania* sp.) in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Anura) inhabiting selected soybean and rice agroecosystems of Argentina. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(3), 579–584.
- Castro, E.R. & Trenchi, H. (1955) Fauna parasitológica comprobada en el Uruguay y bibliografía parasitológica nacional. Laboratorio de Biología Animal ‘‘Dr. Miguel C. Rubino’’, *Boletín N°1 (Pando)*, 1–84.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. (1986) *Biology of Amphibians*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, London, 670 p.
- Duszynski, D.W. & Jones, K.L. (1973) The

- occurrence of intradermal mites, *Hannemania* spp. (Acarina: Trombiculidae), in anurans in New Mexico with a histological description of the tissue capsule. *International Journal of Parasitology*, 3(4), 531–538.
- Ewing, H.E. (1926) The life history and biology of the tree-toad chigger, *Trombicula hylae* Ewing. *Annals of the Entomological Society of America*, 19(3), 261–267.
- Ewing, H.E. (1931) A catalogue of the Trombiculinae, or chigger mites, of the New World, with new genera and species and a key to the genera. *Proceedings of the United States National Museum*, 80, 1–19.
- Hatano, F.H., Gettinger, D., Van Sluys, M. & Rocha, C.F.D. (2007) Parasitism of *Hylodes phyllodes* (Anura: Cycloramphidae) by *Hannemania* sp. (Acari: Trombiculidae) in an area of Atlantic Forest, Ilha Grande, southeastern Brazil. *Parasite*, 14, 107–112.
- Hyland, K.E. (1950) The life cycle and parasitic habit of the chigger mite *Hannemania dumni* Sambon, 1928, a parasite of amphibians. *Journal of Parasitology*, 36 (Suppl.), 32–33.
- Jung, R.E., Claeson, S., Wallace, J. & Welbourn, W.C. (2001) *Eleutherodacylus guttilatus* (Spotted Chirping Frog), *Bufo punctatus* (Red-spotted Toad), *Hyla arenicolor* (Canyon Tree Frog). Mite infestation. *Herpetological Review*, 32(1), 33–34.
- Mendez, D., Freeman, A.B., Spratt, D.M. & Speare, R. (2010) Pathology of cutaneous trombidiosis caused by larval trombiculid mites in a wild Lesueur's tree frog (*Litoria wilcoxii*). *Australian Veterinary Journal*, 88(8), 328–330.
- Shatrov, A.V. (2000) On the origin of parasitism in trombiculid mites (Acariformes: Trombiculidae). *Acarologia*, 41(1–2), 205–213.
- Sladky, K.K., Norton, T.M. & Loomis, M.R. (2000) Trombiculid mites (*Hannemania* sp.) in Canyon tree frogs (*Hyla arenicolor*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(4), 570–575.
- Torrence, S.M., Smith, L.M. & McMurry, S.T. (2007) Larval *Hannemania* sp. infestations of *Spea* spp. in the Southern High Plains, Texas, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 43(4), 742–746.
- Venzal, J.M., Castro, O., Cabrera, P.A., De Souza, C.G. & Gugliemone, A.A. (2003) Las garrapatas de Uruguay: especies, hospedadores, distribución e importancia sanitaria. *Veterinaria (Montevideo)*, 38(150–151), 17–28.
- Westfall, M.C., Cecala, K.K., Price, S.J. & Dorcas, M.E. (2008) Patterns of trombiculid mite (*Hannemania dumni*) parasitism among plethodontid salamanders in the Western Piedmont of North Carolina. *Journal of Parasitology*, 94(3), 631–634.
- Wohlmann, A., Köhler, J. & Martin, P. (2006) Endoparasitic mite infestations of anuran amphibians from Bolivian montane rainforests, with descriptions of two new *Hannemania* species (Acari: Parasitengona: Trombiculidae: Leeuwenhoeekiinae). *Organisms Diversity and Evolution*, 6, 141–150.

# CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

## Quitridiomicosis

Durante el transcurso de este estudio el conocimiento disponible sobre *Bd* ha aumentado notablemente, así como también ha cambiado la visión de la comunidad científica sobre la quitridiomicosis (ver Collins & Crump 2009). Este patógeno está presente en la gran mayoría de las especies de anfibios estudiadas al respecto. Su distribución global y ubicua le confiere particular importancia a los estudios tendientes a comprender mejor los factores ambientales que determinan la presentación de epidemias. Las medidas de conservación tendientes a mitigar de la pérdida de biodiversidad de los anfibios debida a quitridiomicosis deberán basarse en este tipo de información.

El rol de las epidemias de quitridiomicosis en la declinación de anfibios a escala global ha sido en muchos casos sobrevalorado, lo cual amerita una reevaluación. Heard *et al.* (2011) señalan que para 421 especies de anfibios indicadas como aparentemente amenazadas por la

quitridiomycosis en la Lista Roja de especies en peligro de la UICN, solamente se cuenta con alguna evidencia científica al respecto en el 39 % de los casos. La correcta valoración de los efectos de microorganismos patógenos en declinaciones poblacionales de anfibios requerirá en el futuro de un abordaje multidisciplinario con la participación de patólogos veterinarios, biólogos, epidemiólogos y microbiólogos (Duffus 2009).

Al momento de desarrollarse este trabajo la presencia de *Bd* no parece ser un factor de amenaza relevante para estas y otras especies nativas. En este estudio se observó una alta prevalencia de infección por *Bd* en especies de anfibios nativas junto a una mayor diversidad de haplotipos de este patógeno, en ausencia de episodios de mortalidad masiva. Esto podría explicarse por una dinámica de infección correspondiente a un patógeno endémico, en equilibrio con sus hospedadores, como han propuesto recientemente Rodríguez *et al.* (2014) para anfibios de la Mata atlántica. La evidencia aquí aportada no permite descartar la introducción de cepas exóticas de *Bd* por *Lithobates catesbeianus* y otras especies introducidas, pero esta potencial amenaza habría sido posterior a fenómenos de declinación poblacional ocurridos a partir de los años 1970s (Kolenc *et al.* 2009; este estudio). La falta de diagnósticos positivos en el estudio retrospectivo sobre especies nativas tampoco descarta la ocurrencia de declinaciones poblacionales debidas a epidemias en los años 1960s y 1970s. Éstas podrían haber causado una retracción y fragmentación del rango de distribución de *Physalaemus henselii* y *Pleurodema bibroni*, y la eventual extinción local de *Ceratophrys ornata* y *Physalaemus fernandezae* que no se han vuelto a coleccionar en el país respectivamente desde 1982 y 1962 (Barrio 1964; García 1972; Maneyro & Langone 2001).

## **Enfermedad por Ichthyosporidia en anfibios neotropicales**

Los nuevos diagnósticos de infección por parásitos de los Órdenes Dermocystida y Eccrinida en este estudio sugirieron que tanto la dermocistidiosis, y eventualmente también la ictiofonosis de los anfibios, se encontrarían ampliamente distribuidas en Sudamérica. Otras implicancias relevantes de estos diagnósticos son el redescubrimiento de *Dermosporidium hylarum* y su inclusión como especie válida en *Rhinosporidium*, limitando el rango de hospedadores de *R. seeberi* a especies homeotermas. A diferencia de estudios previos, los resultados del análisis filogenético sugieren que al menos para los parásitos de anfibios, la distribución geográfica y el hospedador tienen un limitado valor taxonómico.

## Perspectivas

**Quitridiomicosis.** El uso de técnicas moleculares desarrolladas recientemente para la detección de *Bd* en ejemplares de colecciones viejas y eventualmente expuestos a fijadores con formaldehído (Richards-Hrdlicka 2012), contribuiría a obtener una mayor sensibilidad en estudios retrospectivos como el aquí presentado. Por otra parte sería deseable la caracterización multilocus de las cepas de *Bd* para realizar comparaciones con estudios en otros biomas de la región (ej. Rodríguez *et al.* 2014), y comprender mejor la historia evolutiva del patógeno en el continente.

Faltan además estudios sobre susceptibilidad de infección por *Bd* en especies nativas, factores ambientales que inciden en la prevalencia, intensidad de infección y eventualmente el riesgo de presentación de la quitridiomicosis (ej. Longcore *et al.* 2007). El estudio de esta enfermedad en zonas costeras ofrece un rico campo para investigar los posibles efectos sinérgicos negativos de la destrucción de hábitat, cambios climáticos y patógenos sobre poblaciones en delicado estado de conservación.

**Rinosporidiosis.** El descubrimiento de la infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus* abre un potencial campo para el estudio de la patogenia de este microorganismo. Los efectos deletéreos que causan los dermocistidios parásitos de anfibios han sido escasamente estudiados tanto a nivel individual como poblacional, al igual que los factores que determinan la especificidad de hospedador y la virulencia (ver Federici *et al.* 2015).

**Ictiofonosis.** El primer diagnóstico de ictiofonosis en anfibios fuera de Norteamérica aportado en este trabajo incluye muy poca información asociada. El origen y relaciones taxonómicas de los microorganismos involucrados (*Ichthyophonus* sp.), así como su posible impacto en anfibios nativos precisa de más estudios.

**Enfermedades parasitarias.** El estudio de enfermedades parasitarias y su importancia para la conservación de distintas especies de anfibios nativos puede adquirir importancia en zonas con uso intensivo de la tierra. En Uruguay el aumento de la población humana en áreas costeras va asociado a una mayor densidad de hospedadores definitivos de *Spirometra* como el perro, lo cual podría aumentar la incidencia de esparganosis en los anfibios. Existen



ejemplos de enfermedades parasitarias transmitidas por carnívoros domésticos introducidos que han causado fuerte impacto en poblaciones silvestres de vertebrados locales, por ejemplo sarna sarcóptica y toxoplasmosis (Dickman 1996; Skerratt *et al.* 1999). En el caso de la trombidiasis larvaria la sustitución del tapiz vegetal natural por cultivos agrícolas como arroz y soja ampliamente extendidos en el país puede aumentar en forma importante la carga parasitaria en anfibios (Attademo *et al.* 2012). También son escasos los estudios sobre la relación hospedador-parásito durante la fase larval parasitaria.

**Neoplasias.** Los melanoforomas encontrados en *Hypsiboas pulchellus* son un interesante caso de estudio dado la rareza de su hallazgo en anfibios, la poca información disponible sobre estos tumores, y la posible etiología viral planteada por algunos autores (Oinuma *et al.* 1984).

***Hypsiboas pulchellus* como modelo.** Este anfibio tiene un gran potencial de utilización como modelo de estudio de enfermedades infecciosas, parasitarias y neoplásicas, y sobre los efectos de múltiples patógenos (ej. Romansic *et al.* 2011). Se trata de una especie conspicua que puede encontrarse en distintas épocas del año y en muy diversos ambientes, incluso antropizados, y sus larvas presentan un desarrollo prolongado en condiciones naturales (Gallardo 1961). Al igual que en el caso de los adultos son hospedadores tanto de parásitos eucariotas unicelulares como macroparásitos. Una síntesis de los diagnósticos realizados en este estudio sobre ésta y otras especies de anfibios de Uruguay se muestra en el Apéndice 8.

**Estado de conservación de anfibios nativos.** Los datos sobre retracción del rango de distribución de *Physalaemus henselii* y *Pleurodema bibroni* en Uruguay proveen una línea de base para el monitoreo y estudio a largo plazo de fluctuaciones poblacionales en estas especies. Especial atención merecen poblaciones remanentes en hábitats fragmentados de zonas costeras, más vulnerables a los efectos de estocasticidad ambiental y demográfica (Caughley 1994).

## Referencias

- Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Junges, C., Bassó, A. & Cabagna-Zenkhusen, M. (2012) Trombiculid mites (*Hannemania sp.*) in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Anura) inhabiting selected soybean and rice agroecosystems of Argentina. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(3), 579–584.
- Barrio, A. (1964) Relaciones morfológicas, eto-ecológicas y zoogeográficas entre *Physalaemus henselii* (Peters) y *P. fernandezae* (Müller) (Anura, Leptodactylidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 20, 285–305.
- Caughley, G. (1994) Directions in conservation biology. *Journal of Animal Ecology*, 63(2), 215–244.
- Collins, J.P. & Crump, M.L. (2009) *Extinction in our times. Global amphibian decline*. Oxford University Press, 273 p.
- Dickman, C.R. (1996) *Overview of the impacts of feral cats on Australian native fauna*. Australian Nature Conservation Agency, Canberra. Disponible en: <http://secure.environment.gov.au/biodiversity/invasive/publications/pubs/impacts-feral-cats.pdf> (accedido el 25 mayo de 2014)
- Duffus, A.L.J. (2009) Chytrid blinders: what other disease risks to amphibians are we missing? *EcoHealth*, 6, 335–339.
- Federici, E., Rossi, R., Fidati, L., Paracucchi, R., Scargetta, S., Montalbani, E., Franzetti, A., La Porta, G., Fagotti, A. Simoncelli, F., Cenci, G. & di Rosa, I. (2015) Characterization of the skin microbiota in Italian Stream frogs (*Rana italica*) infected and uninfected by a cutaneous parasitic disease. *Microbes and Environment*, 30(3), 262–269.
- Gallardo, J.M. (1961) Observaciones biológicas sobre *Hyla raddiana* Fitz., de la Provincia de Buenos Aires. *Ciencia e Investigación*, 17, 63–69.
- García, J.E. (1972) Ampliación de la distribución geográfica de *Ceratophrys ornata* (Bell) (Anura, Ceratophrynidae) y algunas observaciones ecológicas. *Physis*, 31(83), 656–658.
- Heard, M., Smith, K.F. & Ripp, K. (2011) Examining the evidence of chytridiomycosis in threatened amphibian species. *PLoS ONE*, 6(8), e23150.
- Kolenc, F., Borteiro, C., Baldo, D., Ferraro, D. & Prigioni, C. (2009) The tadpoles and advertisement calls of *Pleurodema bibroni* Tschudi and *Pleurodema kriegi* (Müller), with notes on their geographic distribution and conservation status (Amphibia, Anura, Leiuperidae). *Zootaxa*, 1969, 1–35.
- Longcore, J.R., Longcore, J.E., Pessier, A. & Halteman, W.A. (2007) Chytridiomycosis widespread in anurans of Northeastern United States. *Journal of Wildlife Management*, 71(2), 435–444.
- Maneyro, R. & Langone, J.A. (2001) Categorización de los anfibios del Uruguay. *Cuadernos de Herpetología*, 15(2), 107–118.
- Oinuma, T., Seki, M. & Asashima, M. (1984) Histological and electron microscopical studies on neoplasia subcutaneously occurring in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the Japan Academy*, 60 B (7), 265–268.
- Richards-Hrdlicka, K.L. (2012) Extracting the amphibian chytrid fungus from formalin-fixed specimens. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(5), 842–849.
- Rodríguez, D., Becker, C.G., Pupin, N.C., Haddad, C.F.B. & Zamudio, K.R. (2014) Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Molecular Ecology*, 23(4), 774–787.
- Romansic, J.M., Johnson, P.T.J., Searle, C.L.,

- Johnson, J.E., Tunstall, T.S., Han, B.A., Rohr, J.R. & Blaustein, A.R. (2011) Individual and combined effects of multiple pathogens on Pacific treefrogs. *Oecologia*, 166(4), 1029–1041.
- Skerratt, L.F., Middleton, D. & Beveridge, I. (1999) Distribution of life cycle stages of *Sarcoptes scabiei* var. *wombati* and effects of severe mange on Common Wombats in Victoria. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(4), 633–646.

## APÉNDICES

**Apéndice 1.** Enfermedades infecciosas, parasitarias y neoplásicas de la piel en anfibios postmetamórficos.

**Apéndice 2.** Especímenes de anfibios estudiados (material en colecciones).

**Apéndice 3.** Retracción del rango de distribución de *Physalaemus fernandezae*, *Physalaemus henselii* y *Pleurodema bibroni* en Uruguay.

**Apéndice 4.** Anfibios encontrados muertos o moribundos durante muestreos de campo en Uruguay (2000–2014).

**Apéndice 5.** Árboles obtenidos en el análisis filogenético de Dermocystida.

**Apéndice 6.** Distancias genéticas en Dermocystida.

**Apéndice 7.** Anfibios examinados en sitios con infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*.

**Apéndice 8.** Resumen de los diagnósticos realizados.

**Apéndice 9.** Publicaciones.

## Apéndice 1. Enfermedades infecciosas, parasitarias y neoplásicas de la piel en anfibios postmetamórficos.

Enfermedad/Agentes	Presentación	Elementos diagnósticos	Fuente (énfasis en anfibios neotropicales)
“Red-leg” ( <i>Aeromonas hydrophila</i> y otras bacterias)	Hemorragias, úlceras	Enrojecimiento de la piel	Emerson & Norris (1905); Dusi (1949); Reichenbach-Klinke & Elkan (1965); Green (2001); Taylor <i>et al.</i> (2001); Hill <i>et al.</i> (2010)
Cromomicosis (= cromoblastomicosis; <i>Cladosporium</i> , <i>Fonsecaea</i> , <i>Phialophora</i> , <i>Scolecobasidium</i> , <i>Wangiella</i> )	Dermatitis nodular de tipo granulomatoso, eritema, manchas oscuras, enfermedad diseminada	Esporas “grano de café” o “cuerpos de Medlar”	Carini (1910); Dhaliwal & Griffiths (1963); Dei-Cas & Mañé-Garzón (1971); Velásquez & Restrepo (1974); Speare (1990); Bube <i>et al.</i> (1992); Miller <i>et al.</i> (1992); Taylor (2001); Joupperi <i>et al.</i> (2002); Kim <i>et al.</i> (2008); de Brito-Gitirana & Silva-Soares (2012)
Zygomycosis o Mucormycosis ( <i>Mucor amphibiorum</i> , <i>Rhizopus</i> )	Nódulos color crema $\geq 1$ mm, úlceras, enfermedad diseminada	Esférulas (5–37 $\mu$ m)	Speare <i>et al.</i> (1994); Berger <i>et al.</i> (1997); Speare <i>et al.</i> (1997); Creeper <i>et al.</i> (1998); Taylor <i>et al.</i> (1999b)
Saprolegniasis ( <i>Achyla</i> , <i>Aphanomyces</i> , <i>Leptolegnia</i> , <i>Saprolegnia</i> )	Dermatitis, tumefacciones y ulceración	Moho blanquecino	Taylor (2001); Kim <i>et al.</i> (2008)
Entomofotoromicosis ( <i>Basidiobolus ranarum</i> )	Dermatitis ulcerativa, palidez de la piel	Conidias y esférulas	Groff <i>et al.</i> (1991); Taylor <i>et al.</i> (1999a); Taylor <i>et al.</i> (1999c); Taylor (2001)
Quitridiomycosis ( <i>Batrachochytrium</i> )	palidez, úlceras, hiperemia, oscurecimiento, erosiones	Esporangios en la epidermis	Berger <i>et al.</i> (1999); Rachowicz & Vredenburg (2004)
Ictiofonosis ( <i>Ichthyophonus</i> )	Tumoraciones (urostilo en metamorfos), úlceras, enfermedad diseminada	Esporangios con doble pared, en distinto estado de actividad	Goodchild (1953); Herman (1984); Mikaelian <i>et al.</i> (2000); Green <i>et al.</i> (2002); Raffel <i>et al.</i> (2006); Sherman <i>et al.</i> (2009); Borteiro <i>et al.</i> (2015b)
Dermocistidiosis ( <i>Dermocystidium</i> , <i>Dermomycoides</i> , <i>Amphibiothecum</i> , <i>Rhinosporidium</i> )	Tumoraciones, úlceras	Nódulos que ulceran, en correspondencia con esporangios en la dermis repletos de endosporas	Pérez (1913); Guyénot & Naville (1922); Poisson (1937); Carini (1940); Jay & Pohley (1981); Pascolini <i>et al.</i> (2003); Raffel <i>et al.</i> (2008); González-Hernández <i>et al.</i> (2010); Borteiro <i>et al.</i> (2014); Federici <i>et al.</i> (2015); Scheid <i>et al.</i> (2015)
Micobacteriosis ( <i>Mycobacterium</i> )	Dermatitis granulomatosa, enfermedad diseminada	Bacilos ácido-alcohol resistentes	Reichenbach-Klinke & Elkan (1965); Shively <i>et al.</i> (1981); Green (2001); Taylor <i>et al.</i> (2001); Michicao & Laplaca (1954, en Wade 1954); Hill <i>et al.</i> (2010)
Acariasis (Acarina, Trombiculidae)	Nódulos cutáneos de color rojo-naranja	Presencia de larvas de ácaros en las lesiones	Sladky <i>et al.</i> (2000); Mendez <i>et al.</i> (2010); Attademo <i>et al.</i> (2012)
Miasis (Diptera, Sarcophagidae)	Heridas profundas	Presencia de larvas en las lesiones	Crump & Pounds (1985); Hagman <i>et al.</i> (2005); Eizemberg <i>et al.</i> (2008); Medina <i>et al.</i> (2009); de Mello-Patiu & de Luna-Dias (2010); Travers & Townsend (2010); de Souza-Pinto <i>et al.</i> (2015)
Esparganosis ( <i>Spirometra</i> , Eucestoda)	Nódulos y tumoraciones	Larvas <i>sparganum</i>	Gomez-Puerta <i>et al.</i> (2010); Bezerra <i>et al.</i> (2012); Borteiro <i>et al.</i> (2015a)
Enfermedad por Iridovirus ( <i>Ranavirus</i> )	Eritema, úlceras, enfermedad diseminada	Inclusiones citoplasmáticas	Gray <i>et al.</i> (2009); Geng <i>et al.</i> (2011)
Neoplasias (adenomas, carcinomas, lipomas, melanoforomas, otros)	Pápulas y nódulos dérmicos	Lesiones histológicas características	Schlumberger & Lucké (1948); Balls (1962); Elkan (1968); Green & Harshbarger (2001); Berger <i>et al.</i> (2004); Stacy & Parker (2004)

## Referencias

- Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Junges, C., Bassó, A. & Cabagna-Zenkhusen, M. (2012) Trombiculid mites (*Hannemania* sp.) in *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Anura) inhabiting selected soybean and rice agroecosystems of Argentina. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(3), 579–584.
- Balls, M. (1962) Spontaneous neoplasms in Amphibia: a review and descriptions of six new cases. *Cancer Research*, 22, 1142–1154.
- Berger, L., Speare, R. & Humphrey, J. (1997) Mucormycosis in a free ranging tree frog from Australia. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(4), 903–907.
- Berger, L., Speare, R., Hyatt, A.D. (1999) Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. En: Campbell, A. (ed.) *Declines and disappearances of Australian frogs*, Environment Australia, Canberra, pp. 23–33.
- Berger, L., Speare, R. & Middleton, D. (2004) A squamous cell carcinoma and an adenocarcinoma in Australian treefrogs. *Australian Veterinary Journal*, 82(1–2), 96–98.
- Bezerra, C.H., Braga, R. da R., Borges-Nojosa, D.M. & Silva, G.A. (2012) Occurrence of spargana infection in *Dermatonotus muelleri* Boettger, 1885 (Anura, Microhylidae) from a coastal complex in northeastern Brazil. *Herpetology Notes*, 5, 69–71.
- Borteiro, C., Cruz, J.C., Kolenc, F., Verdes, J.M., Moraña, A., Martínez Debat, C., Kun, A., Ubilla, M. & Okada, K. (2014) Dermocystid-chytrid coinfection in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *Journal of Wildlife Diseases*, 50(1), 150–153.
- Borteiro, C., Castro, O., Sabalsagaray, M.J., Kolenc, F., Martínez Debat, C. & Ubilla, M. (2015a) Spargana in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) from Uruguay. *Northwestern Journal of Zoology*, 11(1), 171–173.
- Borteiro, C., Verdes, J.M., Cruz, J.C., Sabalsagaray, M.J., Kolenc, F., Martínez Debat, C. & Ubilla, M. (2015b) *Ichthyophonus* sp. (Ichthyophonae, Ichthyophonida) infection in a South American amphibian, the hylid frog *Hypsiboas pulchellus*. *Journal Wildlife Diseases*, 51(2), 530–533.
- Bube, A., Burkhardt, E. & Weiß, R. (1992) Spontaneous chromomycosis in the Marine toad (*Bufo marinus*). *Journal of Comparative Pathology*, 106(1), 73–77.
- Carini, A. (1910) Sur une moisissure qui cause une maladie spontanée du “*Leptodactylus pentadactylus*”. *Annales de L’Institut Pasteur*, 24, 157–160.
- Carini, A. (1940) Sobre um parasito semelhante a um “*Rhinosporidium*”, encontrado em quistos da pele de uma “*Hyla*”. *Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)*, 11, 93–98.
- Creep, J.H., Main, D.C., Berger, L., Huntress, S. & Boardman, W. (1998) An outbreak of mucormycosis in slender tree frogs (*Litoria adelensis*) and white-lipped tree frogs (*Litoria infrataeniata*). *Australian Veterinary Journal*, 76(11), 761–762.
- Crump, M.L. & Pounds, J.A. (1985) Lethal parasitism of an aposematic anuran (*Atelopus varius*) by *Notochaeta bufonivora* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Parasitology*, 71(5), 588–591.
- de Brito-Gitirana, L. & Silva-Soares, T. (2012) Chromomycosis in *Rhinella icterica*. *The Open Zoology Journal*, 5, 38–41.
- de Mello-Patiu, C.A. & de Luna-Dias, C. (2010) Myiasis in the Neotropical amphibian *Hypsiboas beckeri* (Anura: Hylidae) by a new species of *Lepidodexia* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Parasitology*, 96(4), 685–688.
- de Souza-Pinto, F.C., França, I.F. & de Mello-Patiu, C.A. (2015) Brief description of myiasis cases in three amphibian species from the Atlantic forest located in the central region of the state of Minas Gerais, Brazil. *Herpetology Notes*, 8, 287–290.
- Dei-Cas, E. & Mañé-Garzón, F. (1971) Cromoblastomicosis espontánea en un anfibio del Uruguay. *Revista Uruguaya de Patología Clínica y Microbiológica*, 9, 12–23.
- Dhaliwal, S.S. & Griffiths, D.A. (1963) Fungal disease in Malayan toads: an acute lethal inflammatory reaction. *Nature*, 197(4866), 467–469.
- Dusi, J.L. (1949) The natural occurrence of “Redleg”, *Pseudomonas hydrophila*, in a population of American toads, *Bufo americanus*. *Ohio Journal of Science*, 49(2), 70–71.
- Eizemberg, R., Sabagh, L.T. & da Silva Mello, R.

- (2008) First record of myiasis in *Aplastodiscus arildae* (Anura: Hylidae) by *Notochaeta bufonivora* (Diptera: Sarcophagidae) in the Neotropical area. *Parasitology Research*, 102(2), 329–331.
- Elkan, E. (1968) Two cases of epithelial malignancy in Salientia. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 96(2), 496–499.
- Emerson, H. & Norris, C. (1905) “Red-leg”, an infectious disease of frogs. *Journal of Experimental Medicine*, 7, 32–58.
- Federici, E., Rossi, R., Fidati, L., Paracucchi, R., Scargetta, S., Montalbani, E., Franzetti, A., La Porta, G., Fagotti, A., Simoncelli, F., Cenci, G. & Di Rosa, I. (2015) Characterization of the skin microbiota in Italian stream frogs (*Rana italica*) infected and uninfected by a cutaneous parasitic disease. *Microbes and Environments*, 30(3), 262–269.
- Geng, Y., Wang, K.Y., Zhou, Z.Y., Li, C.W., Wang, J., He, M., Yin, Z.Q. & Lai, W.M. (2011) First report of a *Ranavirus* associated with morbidity and mortality in farmed Chinese giant Salamanders (*Andrias davidianus*). *Journal of Comparative Pathology*, 145(1), 95–102.
- Gomez-Puerta, L.A., Chávez, G., Enciso, M.A. & Mendoza, A.P. (2010) Infestación por esparganos en ranas del genero *Pristimantis* (Anura, Strabomantidae) del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 17(2), 265–266.
- González-Hernández, M., Denoël, M., Duffus, A.J.L., Garner, T.W.J., Cunningham, A.A. & Acevedo-Whitehouse, K. (2010) Dermocystid infection and associated skin lesions in free-living palmate newts (*Lissotriton helveticus*) from Southern France. *Parasitology International*, 59(3), 344–350.
- Goodchild, C.G. (1953) A subcutaneous, cyst-parasite of Bullfrogs: *Histocystidium ranae*, n. g., n. sp. *Journal of Parasitology*, 39(4), 395–405.
- Gray, J.M., Miller, D.L. & Hoverman, J.T. (2009) Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87(3), 243–266.
- Green, D.E. (2001) Chapter 27. Pathology of Amphibia. En: Wright, K.M. & Whitaker, B.R. (eds.), *Amphibian medicine and captive husbandry*, Krieger Publishing Co., Malabar, Florida, pp. 401–485.
- Green, D.E., Converse, K.A. & Schrader, A.K. (2002) Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the U.S.A., 1996–2001. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969, 323–339.
- Green, D.E. & Harshbarger, J.C. (2001) Chapter 26. Spontaneous neoplasia in Amphibia. En: Wright, K.M. & Whitaker, B.R. (eds.), *Amphibian medicine and captive husbandry*, Krieger Publishing Co., Malabar, Florida, pp. 335–400.
- Groff, J.M., Mughannam, A., McDowell, T.S., Wong, A., Dykstra, M.J., Frye, F.L. & Hedrick, R.P. (1991) An epizootic of cutaneous zygomycosis in cultured dwarf African clawed frogs (*Hymenochirus curtipes*) due to *Basilobodus ranarum*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 29(4), 215–223.
- Guyénot, E. & Naville, A. (1922) Un nouveau protiste du genre *Dermocystidium* parasite de la Grenouille *Dermocystidium ranae* nov. spec. *Revue Suisse de Zoologie*, 29, 133–145.
- Hagman, M., Pape, T. & Schulte, R. (2005) Flesh fly myiasis (Diptera, Sarcophagidae) in Peruvian poison frogs genus *Epipedobates* (Anura, Dendrobatidae). *Phyllomedusa*, 4(1), 69–73.
- Herman, R.L. (1984) *Ichthyophonus*-like infection in newts (*Notophthalmus viridescens* Rafinesque). *Journal of Wildlife Diseases*, 20(1), 55–56.
- Hill, W.A., Newman, S.J., Craig, L., Carter, C., Czarra, J. & Brown, J.P. (2010) Diagnosis of *Aeromonas hydrophila*, *Mycobacterium* species, and *Batrachohyctrium dendrobatidis* in an African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 49(2), 215–220.
- Jay, J.M. & Pohley, J.W. (1981) *Dermosporidium penneri* sp. n. from the skin of the American Toad, *Bufo americanus* (Amphibia: Bufonidae). *Journal of Parasitology*, 67(1), 108–110.
- Juopperi, T., Karli, K., De Voe, R. & Grindem, C.B. (2002) Granulomatous dermatitis in a Spadefoot toad (*Scaphiopus holbrooki*). *Veterinary Clinical Pathology*, 31(3), 137–139.
- Kim, S., Eom, A., Park, D. & Ra, N. (2008) Detection of infectious fungal diseases of frogs inhabiting in Korea. *Mycobiology*, 36(1), 10–12.
- Medina, D., Rivera, M., Cossio, R., Medina, E. & Bermúdez, S. (2009) Primer registro de miasis por Sarcophagidae (Díptera: Oestroidea) en *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Anura: Centrolenidae) de Panamá. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80, 263–264.

- Mendez, D., Freeman, A.B., Spratt, D.M. & Speare, R. (2010) Pathology of cutaneous trombidiosis caused by larval trombiculid mites in a wild leslueur's tree frog (*Litoria wilcoxii*). *Australian Veterinary Journal*, 88(8), 328–330.
- Mikaelian, I., Ouellet, M., Pauli, B. Rodrigue, J., Harshbarger, J.C. & Green, D.M. (2000) *Ichthyophonus*-like infection in wild amphibians from Québec, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40(3), 195–201.
- Miller, E.A., Montali, R.J., Ramsay, E.C. & Rideout, B.A. (1992) Disseminated chromoblastomycosis in a colony of Ornate-horned frogs (*Ceratophrys ornata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 23(4), 433–438.
- Pascolini, R., Daszak, P., Cunningham, A.A., Tei, S., Vagnetti, D., Bucci, S., Fagotti, A. & Di Rosa, I. (2003) Parasitism by *Dermocystidium ranae* in a population of *Rana esculenta* complex in Central Italy and description of *Amphibiocystidium n. gen.* *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(1), 65–74.
- Pérez, C. (1913) *Dermocystidium pusula*. Parasite de la peau des Tritons. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 52, 343–357.
- Poisson, R. (1937) Sur une nouvelle espèce du genre *Dermomycoïdes* Granata 1919: *Dermomycoïdes armoriacus* Poisson 1936 parasite cutané de *Triturus palmatus* (Schneider): genèse et structure de la zoospore. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique (Woods Hole)*, 71, 91–116.
- Rachowicz, L.J. & Vredenburg, V.T. (2004) Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1–2), 75–83.
- Raffel, T.R., Dillard, J.R. & Hudson, P.J. (2006) Field evidence of leech-borne transmission of amphibian *Ichthyophonus* sp. *Journal of Parasitology*, 92(6), 1256–1264.
- Raffel, T.R., Bommarito, T., Barry, D.S., Witiak, S.M. & Shackelton, L.A. (2008) Widespread infection of the Eastern red-spotted newt (*Notophthalmus viridescens*) by a new species of *Amphibiocystidium*, a genus of fungus-like mesomycetozoan parasites not previously reported in North America. *Parasitology*, 135(2), 203–215.
- Reichenbach-Klinke, H. & Elkan, E. (1965) *The principal diseases of lower vertebrates*. Academic Press, London & New York, 600 p.
- Scheid, P., Balczun, C., Dehling, J.M., Ammon, A. & Sinsch, U. (2015) Rhinosporidiosis in African reed frogs *Hyperolius* spp. caused by a new species of *Rhinosporidium*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 115(2), 111–120.
- Schlumberger, H.H. & Lucké, B. (1948) Tumors of fishes, amphibians and reptiles. *Cancer Research*, 8, 657–754.
- Sherman, E., Tock, K. & Clarke, C. (2009) Fluctuating asymmetry in *Ichthyophonus*-sp. infected newts, *Notophthalmus viridescens*, from Vermont. *Applied Herpetology*, 6, 369–378.
- Shively, J.N., Songer, J.G., Prchal, S., Keasey III, M. & Thoen, C.O. (1981) *Mycobacterium marinum* infection in Bufonidae. *Journal of Wildlife Diseases*, 17(1), 3–7.
- Sladky, K.K., Norton, T.M. & Loomis, M.R. (2000) Trombiculid mites (*Hannemania* sp.) in Canyon tree frogs (*Hyla arenicolor*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(4), 570–575.
- Speare, R. (1990) A review of the diseases of the Cane toad, *Bufo marinus*, with comments on biological control. *Australian Wildlife Research*, 17, 387–410.
- Speare, R., Thomas, A.D., O'Shea, P. & Shipton, W.A. (1994) *Mucor amphibiorum* in the toad, *Bufo marinus*, in Australia. *Journal of Wildlife Diseases*, 30(3), 399–407.
- Speare, R., Berger, L., O'Shea, P., Ladds, P.W. & Thomas, A.D. (1997) Pathology of mucormycosis of Cane toads of Australia. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(1), 105–111.
- Stacy, B.A. & Parker, J.M. (2004) Amphibian oncology. *Veterinary Clinics of North America (Exotic Animal Practice)*, 7, 673–695.
- Taylor, S.K. (2001) Chapter 14. Mycoses. En: Wright, K.M. & Whitaker, B.R. (eds.) *Amphibian medicine and captive husbandry*, Krieger Publishing, Malabar, pp. 159–179.
- Taylor, S.K., Williams, E.S. & Mills, K.W. (1999a) Mortality of captive Canadian toads from *Basidiobolus ranarum* mycotic dermatitis. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(1), 64–69.
- Taylor, S.K., Williams, E.S., Pier, A.C., Mills, K.W. & Bock, M.D. (1999b) Mucormycotic dermatitis in captive adult Wyoming toads. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(1), 70–74.
- Taylor, S.K., Williams, E.S., Thorne, T., Mills, K.W., Withers, D.I. & Pier, A.C. (1999c) Causes of mortality of the Wyoming toad. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(1), 49–57.
- Taylor, S.K., Green, D.E., Wright, K.M. & Whitaker,



- B.R. (2001) Chapter 13. Bacterial Diseases. En: Wright, K.M. & Whitaker, B.R. (eds.) *Amphibian medicine and captive husbandry*, Krieger Publishing, Malabar, pp. 181–191.
- Travers, S.L. & Townsend, J.H. (2010) Myiasis on a Neotropical leaf frog *Agalychnis saltator* Taylor, 1955. *Herpetology Notes*, 3, 355–357.
- Velásquez, L.F. & Restrepo, A. (1974) Cromomycosis natural en el *Bufo marinus*. *Actualidades Biológicas*, 3(9), 58–62.
- Wade, H.H. (1954) Current literature. Michicao, N. and Laplaca, E. Lepra-like granulomas in frogs. *Lab. Invest.* 3 (1954) 219-227. *International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases*, 22(3), 373–374.

## Apéndice 2. Especímenes de anfibios estudiados (material en colecciones).

### Acrónimos de colecciones:

**CENAI:** Centro Nacional de Iología, Buenos Aires, Argentina, actualmente incorporada a la colección **MACN**, Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, Buenos Aires, Argentina; **CFBH:** Colección Célio F. B. Haddad, Departamento de Zoología, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil; **MCN:** Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil; **MCT:** Museu de Ciências e Tecnologia, Setor Herpetologia, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre; **UFRGS:** Coleção Herpetologica, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre; **MNHN:** Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay; **ZVCB:** Colección de Batracios, Departamento de Zoología-Vertebrados, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.

### Lista de especímenes:

*Ceratophrys ornata*.—URUGUAY. Departamento de Montevideo. Barra de Santa Lucía, CENAI 4478–4481 (23/XI/1970).

*Dendropsophus sanborni*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Floresta Estadual Edmundo de Navarro de Andrade, Município Rio Claro, CFBH 39088 (4/XI/2014), Tietê, alrededores, carretera a Capivari, Município de Tietê, CFBH 39196–39198 (30/X/2014).

*Dendropsophus nanus*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Sitio Cantaclaro, Distrito de Itapê, Município de Rio Claro, CFBH 39125, 39126 (3/XI/2014).

*Elachistocleis cesarii*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Sitio Cantaclaro, Distrito de Itapê, Município de Rio Claro, CFBH 39127 (3/XI/2014).

*Hypsiboas albopunctatus*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Sitio Cantaclaro, Distrito de Itapê, Município de Rio Claro, CFBH 39113–39115, 39123 (3/XI/2014); Tietê, alrededores, carretera a Capivari, Município de Tietê, CFBH 39190, 39191 (30/X/2014).

*Hypsiboas faber*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Tietê, alrededores, carretera a Capivari, Município de Tietê, CFBH 39135, 39136 (31/X/2014).

*Hypsiboas lundii*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Mata de Universidade Federal de São Carlos, Município de São Carlos, CFBH 39090, 39091 (1/XI/2014).

*Hypsiboas pulchellus*.—ARGENTINA. Provincia de Buenos Aires. Berisso, MNHN 6777–6780 (22/XI/1982).—BRASIL. Estado de Rio Grande do Sul, São Gabriel, Río Santa Maria, MNHN 1316, 1317, 4522–4534 (10/I/1962). —URUGUAY. Departamento de Rocha. La Paloma, camino a Laguna de Rocha, MNHN 9506 (17/IV/2013), MNHN 9478 (11/VIII/2011), 9503, 9507 (17/VIII/2013), 9508, 9509 (9/XI/2013); Laguna de Castillos, MNHN 7489, 7736–7740 (15–18/VIII/2008), Laguna de Rocha, MNHN 9525 (17/VIII/2013), MNHN 9527 (5/II/2014). Departamento de San José. Paso Mauricio, próximo al Arroyo Mauricio, MNHN 9505 (2/XI/2007). Departamento de Treinta y Tres. Valentines, MNHN 9477 (5/IX/2009).

*Leptodactylus fuscus*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Parque Ecológico, Universidade Federal de São Carlos, Município de São Carlos, CFBH 39092 (1/XI/2014), Sitio Cantaclaro, Distrito de Itapê, Município de Rio Claro, CFBH 39112, 39124 (3/XI/2014); Tietê, alrededores, carretera a Capivari, Município de Tietê, CFBH 39189 (30/X/2014).

*Leptodactylus latrans*. —URUGUAY. Departamento de Rocha. La Paloma, camino a Laguna de Rocha, MNHN 9526 (5/II/2014).

*Melanophryniscus montevidensis*.—URUGUAY. Departamento de Rocha. Ruta 10 km 227, MNHN 9522 (5/III/2008).

*Melanophryniscus sanmartini*.—URUGUAY. Departamento de Treinta y Tres. Valentines, MNHN 9510 (5/VII/2009).

*Ololygon berthae*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Parque Ecológico, Universidade Federal de São Carlos, Município de São Carlos, CFBH 39096–39100, 39128 (1/XI/2014).

*Itapotihyla langsdorffii*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Floresta Estadual Edmundo de Navarro de Andrade, Município de Rio Claro, CFBH 39087, 39062–39072, 39085, 39086 (4/XI/2014).

*Physalaemus centralis*.—BRASIL. Estado de São Paulo, Estado de São Paulo. Floresta Estadual Edmundo de Navarro de Andrade, Município de Rio Claro, CFBH 39084 (4/XI/2014).

*Physalaemus cuvieri*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Tietê, alrededores, carretera a Capivari, Município de Tietê, CFBH 39188 (30/X/2014), 39134 (31/X/2014).

*Physalaemus fernandezae*.—URUGUAY. Departamento de Canelones. Arroyo Solís, Camino Pando Punta del Este, CENAI 156/1 (VIII/1960). Departamento de Florida. Estancia San Lorenzo, Cerro Colorado, MNHN 1164 (25/VIII/1962). Departamento de Montevideo. Barra del Río Santa Lucía, Santiago Vázquez, CENAI 122 (n = 39, IX/1962), 3261 (III/1969); Santiago Vázquez, MNHN 1165 (10/IX/1962).

*Physalaemus henselii*.—ARGENTINA. Provincia de Entre Ríos. Gualeguaychú, CENAI 140 (13/VII/1963).—BRASIL. Estado de Rio Grande do Sul. Sin localidad, UFRGS 694 (s/fecha); Agronomia, Porto Alegre, MCN 736, 738, 741, 742, 744–746, 749, 750, 752, 753, 755, 760, 762–765, 768 (1955); Arroio dos Ratos, MCN 9980–9987 (1976); Bagé, MCN 9227 (1975); Barra do Ribeiro, MCN 10971 (1976); Cachoeira do Sul, MCN 2131 (1962); Cachoeirinha, MCN 3665, 3666 (1966); Caçapava do Sul, MCN 9431 (1975), MCT 9885 (4/I/2007); Campo de transmissores do Ministério da Aeronáutica, Canoas, MCN 1444–1446 (1958); Canela, MCN 26 (1975); Caxias do Sul, MCN 7616 (1974); Chaleira Preta, Montenegro, MCN 11504 (1977); Cidreira, Tramandaí, MCN 9519, 9520 (1975); Colônia de São Pedro, Torres, MCN 11024 (1976); Eldorado do Sul, MCT 2148, 2766, 2767 (29/VI/1996); Estação Ecológica do Taim, UFRGS 700 (23/X/1980), 962, 963 (s/fecha); Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Eldorado do Sul, UFRGS 2753 (9/XI/2007), 3163, 3165, 3166 (26/VI/2008), 3339–3346 (3–4/XI/2008), 3767 (17/IV/2009), 4849 (6/VI/2010); Estância Guabijú, Santana do Livramento, MCN 8761 (1975), 10795 (1976); Estância S. Roberto, Quaraí, MCN 2509, 2510 (1964); Fazenda de Ari Velho, 34 km da cidade, Bom Jesus, MCN 9839 (1976); Fazenda Capão da Freguesia, São Jerônimo, MCN 12886, 12985 (1982); Fazenda do Umbu, Cruz Alta, MCN 8870 (1975); Fazenda Santa Catarina, Bossoroca, MCN 5667 (1973); FINEP, Novo Hamburgo, MCN 10358 (1979); Gravataí, MCN 4694 (1972), 6036 (1973); Guaíba, MCN 8321 (1975), 9973, 12383 (1976); Guaíba Country Club, Guaíba, MCN 5544 (1973); Ilha das Flores, Porto Alegre, MCN 9664 (1976); Emboabas, Osório, MCN 377, 378, 381–384, 387, 389 (1955); Estrada Poa-Viamão, parada 44, Viamão, MCN 1235 (1956); Itaimbezinho, Cambará do Sul, MCN 287 (1955), 1444–1446 (1958), 2200 (1984), 2372, 2375–2383, 2387 (1962); Itaúba, Arroio do Tigre, MCN 11632 (1977); Jardim Botânico, Porto Alegre, MCN 7119 (1974); Lagoa do Jacaré, Torres, MCN 10285 (1976); Lagoa Saloba, Santa Vitória do Palmar, MCN 12098 (1976); Linha Imperial, Nova Petrópolis, MCN 4410, 4617 (1971); 5553 (1973); Montenegro, MCN 11041, 11382 (1977); Morro da Polícia, Porto Alegre, MCN 954–962, 964, 967, 968, 970–975, 977–980, 982–986 (1956); Morro São Pedro, Porto Alegre, MCN 946 (1956); Osório, MNHN 836 (1955); Parque Estadual do Tainhas, São Francisco de Paula, MCN 13856 (2006); Passo do Vigário, Viamão, MCN 1561 (1959), 1821, 1822 (1960); Pelotas, MCN 1837, 1838 (1961), 2117 (1963), 9260 (1975); Ponta Grossa, Porto Alegre, MCN 774, 776 (1956); Porto Alegre, MCN 8289, 8290 (1975), MCT 149 (28 abril 1963), 161 (27 marzo 1965), 310 (1966); Praia de Atlântida, Osório, MCN 9650 (1976); Praia Florida, Guaíba, MCN 297 (1955); São Francisco de Paula, MCN 1335 (1957); São Sepé, MCT 11360, 11361 (27/VI/2010), UFRGS 2675, 2676 (22/XI/2006); Teresópolis, Porto Alegre, MCN 58 (1956), 530, 532 (1955), 1611, 1613 (1961), 2151 (1962); Torres, MCN 2591 (1963), 3208 (1961), 8503–8508 (1974); Tramandaí MCN 1302 (1957); Triunfo, MCN 11053, 11538, 11539 (1977); Viamão, MCN 1030, 1089, 1235 (1956), MCT 67, 150–160 (1967), 11638 (30/IV/2004), 11703, 11706–11710 (2/VIII/2007). Estado de Santa Catarina. Hotel Ravenac, Laguna, MCN 11970 (1976).—URUGUAY. Departamento de Canelones. Aeropuerto de Carrasco, MNHN 1514 (18/VII/1965), 6854 (3/I/1970); Arroyo La Tuna, CENAI 3069 (VII/1968), ZVCB 526 (27/VII/1968); Arroyo Solís, Camino Pando-Punta del Este, CENAI 156/2 (VIII/1960); Bañado Tigre Viejo, ZVCB 309 (24/IV/1965); Bañados de Atlántida, ZVCB 648 (23/X/1960); La Tuna, MNHN 6811, 6812 (26/VII/1968); Lagomar, MNHN 1142, ZVCB 633 (21/VIII/1960); ruta interbalnearia km 65,5, ZVCB 1307 (24/VIII/1975); Salinas, MNHN 1145 (30/IX/1960). Departamento de Cerro Largo. Arroyo de la Mina, 8 km SE de Aceguá, ZVCB 2053 (16/II/1970), ZVCB 2414, 3438 (15/V/1970); Mazangano, ZVCB 1118 (19/II/1961); Sierra de Vaz, Río Tacuarí, 20 km SE de Melo, MNHN 1227 (21/III/1963), 1526, 1527 (10/III/1963); Melo, CENAI 170 (n = 2, s/fecha); Río Tacuarí, MNHN 1147, 1532 (20–22/III/1963). Departamento de Colonia. Colonia del Sacramento, CENAI 166 (n = 2, s/fecha); Santa Ana, Artilleros, MNHN 452 (6/II/1958); Departamento de Durazno. 3 km NW Estación km 329, ruta a Blanquillo, Rincón de Las Piedras, ZVCB 1386 (20–29/I/1976); Arroyo del Estado, MNHN 6814 (VII/1980); Paso de la Cruz, Arroyo del Cordobés, ZVCB 417 (I/1953), 2397 (8–20/I/1963). Departamento de Florida. Arroyo Milano, ZVCB 173 (12/II/1970); Florida, CENAI 171 (s/fecha). Departamento de Lavalleja. Aguas Blancas, ZVCB 383 (X/1953), 505 (6/VII/1967); Arequita, MNHN 460 (s/fecha); Arroyo de la China, MNHN 1141 (9/III/1963); Cerro Verdún, ZVCB 1448 (31/VIII/1975); Estación Solís, MNHN 1146, ZVCB 635 (28/VIII/1960); Estancia Bella Vista, próximo a Zapicán, MNHN 698 (X/1958). Departamento de Maldonado. Cerro Pan de Azúcar, MNHN 1138 (11/VI/1961), 1990 (26/X/1971), 2399 (25/VIII/1973), ZVCB 460 (IV/1954); Estancia las Flores, Pan de Azúcar, ZVCB 1087 (VIII/1957), Laguna del Diario, ZVCB 3813 (10/IV/1941); Las Flores, ZVCB 1829, 1830 (23/VIII/1981); Piriápolis, MNHN 480 (28/X/1955); Sierra de Ánimas, MNHN 1668 (15/X/1966), ZVCB 191 (n = 2, III/1953), 693 (30/VIII/1953), 1377 (18/IV/1953). Departamento de Montevideo. Barra del Río Santa Lucía, Santiago Vázquez, CENAI 123 (IX/1962), 732 (30/IX/1962), 598–618 (s/fecha), 3262 (III/1969); Carrasco, MNHN 1137 (10/IX/1962), 2462 (20/XI/1962), ZVCB 873 (XII/1952); Pajas Blancas, ZVCB 1638 (10/IX/1979). Departamento de Río Negro. Arroyo Salsipuedes grande, MNHN1606 (13/VII/1966). Departamento de Rivera. Escuela de Agronomía, MNHN 1144

(19/II/1962); Establecimiento El Palenque, ZVCB 7064, 7065, 7103 (9/IV/2001); Establecimiento Rocha, ZVCB 6780–6782, 6786, 6787, 6852, 6866, 6905, 6911, 6983, 7202, 7203, 7214, 7222 (9/IV/2001), 7287, 7289, 7585 (7/IV/2001), 7944, 7945, 8003 (13/V/2001), 8594 (11/XI/2001), 9029 (13/I/2002), 9907, 9908, 9916, 9920–9922 (10/II/2002); Establecimiento Trinidad, ZVCB 5028 (9/III/2001), 5140, 5246, 5280, 5307, 5312, 5325, 5326, 5355, 5466, 5636, 5637, 5641, 5666, 5685, 5702 (23/III/2001), 6629, 6632, 6637, 6638, 6644, 6658, 6682, 6683, 6713, 6715, 6736, 6760 (9/IV/2001), 7730–7734, 7841, 7842, 7866, 7876, 7882, 7883 (13/V/2001), 8080, 8081, 8089 (10/VI/2001), 8138 (8/VII/2001), 8207 (11/VIII/2001), 8311 (15/IX/2001), 8451, 8494 (13/X/2001), 8511, 8732 (11/XI/2001), 8925 (13/I/2002), 9347 (11/XI/2001), 9402, 9492, 9556 (9/II/2002); Establecimiento Vázquez, ZVCB 5410, 5431, 5457, 5472, 5508, 5509, 5554–5556, 5585, 5586–5588, 5634, 5719, 5742, 5756, 5804, 5805, 5813, 5823, 5829, 5840, 5841, 5880, 5881, 5958, 5996, 6022 (23/III/2001), 6160, 6176, 6244, 6296, 6381, 6447, 6507, 6524–6526, 6674, 6827, 6978, 7157, 7247 (9/IV/2001), 7993 (13/V/2001), 8120 (10/VI/2001), 8296 (15/IX/2001), 8411, 8473, 8474 (13/X/2001), 8527, 8546, 8590, 8591 (11/XI/2010), 8810, 8851, 8898 (11/XII/2001), 9040, 9044, 9058, 9059, 9133 (13/I/2002); Pueblo Madera, ruta 5 km 492, MNHN 9512 (18/VI/2006), ZVCB 11180–11183 (2/V/2003), 17128 (18/VI/2006). Departamento de Rocha. Aguas Dulces, ZVCB 4020 (10/V/2000), Arroyo Valizas, ZVCB 1438 (10/VII/1977); Barra de Valizas, ZVCB 15213 (3/VI/2007), 17129 (10/III/2007); 17131 (1/V/2007); Camino del Indio, ZVCB 1777 (9/V/1981); Ciudad de Rocha, ZVCB 625 (12/VII/1960); La Coronilla, ZVCB 18474 (1/VI/2007), 19598 (30/V/2007); Parque Andresito, La Paloma, ZVCB 2226 (16/IV/1973); Parque Nacional San Miguel, MNHN 1135 (28/VII/1964), ZVCB 3341 (IX/1953); Puntas del Arroyo San Carlos, MNHN 415 (29/X/1956); Refugio de Fauna Laguna de Castillos, MNHN 6841 (18/V/2000); ruta 10 km 248,8, ZVCB 17130 (10/III/2007). Departamento de San José. 2 km W de Playa Pascual, MNHN 6961 (22/VIII/1982); 3 km W de Playa Pascual, MNHN 6813 (20/VI/1982); Arazatí, ZVCB 1265, 1267, 1269, 1270 (27/IV/1975); Arroyo Pereira, Rincón de Arazatí, MNHN 1143 (21–25/IV/1961), ZVCB 723 (21–25/VII/1961); Arroyo Valdez, MNHN 1466 (27/VI/1965); Delta del Tigre, ZVCB 1277, 1279, 1280 (12/V/1975); Playa Pascual, ZVCB 1287 (10/V/1975), 2430 (17/X/1970); Sierra de Mahoma, ZVCB 486 (IV/1954). Departamento de Salto. El Espinillar, ZVCB 2090 (24/IX/1982); Río Arapey, 4 km SW de las Termas del Arapey, ZVCB 1528 (21/III/1978). Departamento de Soriano. 10 km de Arroyo Grande, MNHN 1140 (16/III/1962); Arroyo del Perdido, 10 km de Arroyo Grande, ZVCB 761 (16/IV/1962); Estancia Santa Rita a 7 km de Ombúes de Lavalle, ZVCB 3437 (10/IV/1974); Puerto Aldao, ZVCB 687 (II/1953); Soriano, CENAI 167 (s/fecha). Departamento de Tacuarembó. 7 km aguas arriba de la desembocadura del Río Tacuarembó, MNHN 1139 (13/III/1961), ZVCB 707 (13–20/III/1961); Paso Estevez, Arroyo Quebrada chico, MNHN 451 (20/II/1958). Departamento de Treinta y Tres. Ciudad de Treinta y Tres CENAI 169 (n = 2, s/fecha); Santa Clara de Olimar, MNHN 877 (II/1960), ZVCB 173 (12/II/1960), 450 (1/XII/1957); Olimar chico, 25 km SW de la ciudad de Treinta y Tres, MNHN 1136 (8/IV/1963); Río Olimar a 24 km del Río Cebollatí, ZVCB 607 (14–27/II/1960).

*Physlaemus nattereri*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Parque Ecológico, Universidade Federal de São Carlos, Município de São Carlos, CFBH 39095 (1/XI/2014).

*Pleurodema bibroni*.—BRASIL. Estado de Rio Grande do Sul. Boca da Serra, Município de São Francisco de Paula, MCN 54 (I/1955); Cazuza Ferreira, Município de São Francisco de Paula, MCN 5533, 5534, 5536, 5537 (24/III/1973); Farrroupilha, MCN 5574; Fazenda de Ari Velho, 34 km de la ciudad, Município de Bom Jesus, MCN 9847–9852 (2/XI/1976); Itaimbezinho, Município de Cambará do Sul, MCN 2428 (1–4/XI/1962); Linha Imperial, Município de Nova Petrópolis, MCN 7401 (20/XII/1973); Río Tainhas, cercanías del Río Cipó, MCN 1333 (28/I/1957); Vacaria, MCN 6616–6622 (12–15/I/1974); Veraneio Hampel, Município de São Francisco de Paula, MCN 55 (I/1955).—URUGUAY. Sin localidad, ZVCB 3132. Departamento de Artigas. Arroyo Tres Cruces, ZVCB 1093. Departamento de Canelones. Arroyo Tropa Vieja, CENAI 4951, 4954–4964 (14/X/1970); Atlántida, ZVCB 185; Bañados de Carrasco, ZVCB 186; Ciudad de Canelones, ZVCB 685; Jaureguiberry, MNHN 9455 (20/VI/2011); Las Toscas, ZVCB 47, 48, 11082, 11083; Salinas, MNHN 942 (30/IV/1961); Sauce, MNHN 2102 (8/VI/1973). Departamento de Florida. Estancia San Lorenzo, Reboledo, MNHN 946 (1/I/1965). Departamento de Lavalleja. Aiguá, MNHN 2499 (s/fecha); Arequita, ZVCB 563, 1791; Arroyo Minas Viejas, ZVCB 605; Arroyo Tapes de Godoy, MNHN 945 (9/III/1963), ZVCB 11096; 15 Km SW Arroyo Tapes Godoy, ZVCB 368, 919; Cañada de los Troncos, ruta 8 Km 162, próximo al Arroyo Marmarajá, ZVCB 1403; Cerro Arequita, MNHN 441 (s/fecha); Estancia Bella Vista, Nico Pérez, MNHN 601, 706 (11/X/1958); Estancia La Salvaje, ruta 81, 13 km de la intersección con ruta 8, MNHN 5522 (III/1986); Río Cebollatí, Barra de los Tapes, ZVCB 38; Tapes, ZVCB 803, 11080. Departamento de Maldonado. Sin localidad, MNHN 309 (3 especímenes, 1939); Cerro San Antonio, Piriápolis, MNHN 359 (13/VII/1957); Pan de Azúcar, MNHN 2063, 2103 (26/IX/1971); Punta del Este, intersección de calles 11 y 12, ZVCB 3159; Punta José Ignacio, ZVCB 679; puntas del Arroyo San Carlos, MNHN 478 (29/X/1956). Departamento de Montevideo. Bañados de Carrasco, ZVCB 184, 548, 11077, 11078; Barra de Santa Lucía, CENAI sin número (30/IX/1969, lote de cientos de ejemplares), CENAI 3974 (IV/1970), 6250, 6252–6255, 6258, 6259, 6262, 6264, 6265, 6267–71 (16/VI/1972), 6339, 6373, 6379, 6382, 6408–6415, 6480–6485 (17/VII/1972), 8059–8066 (VII/1972); Camino Carrasco, ZVCB 479 (VI/1953), 2025 (s/fecha), 11064–11073, 11079 (VI/1953); Carrasco, MNHN 311 (18/XI/1956), 355 (IX/1956),

414 (7/XII/1957), CENAI 3491 (IX/1969); Carrasco, Parque Nacional, ZVCB 380; Malvín, ZVCB 377, 684, MNHN 435 (17/VII/1958); Puente sobre el Arroyo Carrasco, MNHN 1575 (3/III/1966); Santiago Vázquez, MNHN 6816 (19/IX/1969). Departamento de Rocha. Barra de Valizas, MNHN 6815 (2/I/1988), 7167 (3/VI/2007, larvas), 7169, 7170 (6/V/2007), ZVCB 1004, 16137; Cerro Verde, MNHN 7352 (22/VI/2008); La Coronilla, MNHN 944 (II/1963); Laguna de las Nutrias, MNHN 9457, 9458 (20/XII/2011); Laguna Garzón, MNHN 329 (4/VIII/1956); La Paloma, MNHN 302 (8/XI/1956), 361 (1957), ZVCB 17127; La Pedrera, CENAI 4939–4941 (10–14/II/1969), 8054, 8055 (III/1968); Refugio de Fauna Laguna de Castillos, MNHN 7353 (18/III/2008); Rocha: MNHN 486 (X/1956); Oceanía del Polonio, ruta 10 km 255, MNHN 7171 (23/IX/2007); Santa Teresa, Playa Las Achiras, MNHN 6817 (II/1984). Departamento de San José. Arazatí, MNHN 2612 (11/X/1981); Autódromo Nacional, ruta 1 km 27,5, ZVCB 3946; Delta del Tigre, MNHN 943 (1/XII/1962); Playa Pascual, CENAI 4176–4178 (s/fecha); Playa Pascual, 10 km NW de Santiago Vázquez, ZVCB 2431. Departamento de Treinta y Tres. Santa Clara de Olimar, ZVCB 413, 11081; Valentines, MNHN 9456 (5/VII/2009).

*Scinax fuscovarius*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Floresta Estadual Edmundo de Navarro de Andrade, Município de Rio Claro, CFBH 1374, 5233–5235, 5293–5295, 5592–5294, 17133–17135, 17557, 19629, 39073–39083 (4/XI/2014); Parque Ecológico, Universidade Federal de São Carlos, Município de São Carlos, CFBH 39093, 39094 (1/XI/2014); Sitio Cantaclaro, Distrito de Itapé, Município de Rio Claro, CFBH 5579–5583, 39101–39107, 39109–39111, 39116–39119, 39120–39122 (3/XI/2014); Tietê, alrededores, carretera a Capivari, Município de Tietê, CFBH 39192–39195 (30/X/2014), 39129–39133 (31/X/2014).

*Scinax granulatus*.—URUGUAY. Departamento de Treinta y Tres. Bañado de los Oliveras, MNHN 9528 (22/I/2006).

*Scinax similis*.—BRASIL. Estado de São Paulo. Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade, Município de Rio Claro, CFBH 6003, 39089 (4/XI/2014); Sitio Cantaclaro, Distrito de Itapé, Município de Rio Claro, CFBH 7148, 7151, 39108 (3/XI/2014).

*Scinax squairostris*.—URUGUAY. Departamento de Rocha. La Paloma, camino a Laguna de Rocha, MNHN 9528 (2/VIII/2013).

*Xenopus laevis*.—URUGUAY. Departamento de Canelones. Atlántida (acuario comercial), MNHN 9523 (28/I/2011; n = 4). Departamento de Montevideo. Rincón del Cerro, Montevideo (criadero y acuario comercial), MNHN 9524 (13/VII/2011; n = 11).

### **Apéndice 3.** Retracción del rango de distribución de *Physalaemus fernandezae*, *Physalaemus henselii* y *Pleurodema bibroni* en Uruguay.

Se reunió información sobre distribución geográfica actual e histórica de las especies estudiadas teniendo en cuenta registros en la literatura, material en colecciones (ver Apéndice 2), y datos obtenidos entre los años 2000 y 2014 durante 313 visitas no sistemáticas a 41 localidades principalmente del sur y este de Uruguay. Se constató la existencia de ejemplares en colecciones para 33 de los 41 sitios visitados (80,5 %), pero solamente en 10 se pudo detectar al menos una de las especies (24,4 %), ver tabla 3.I.

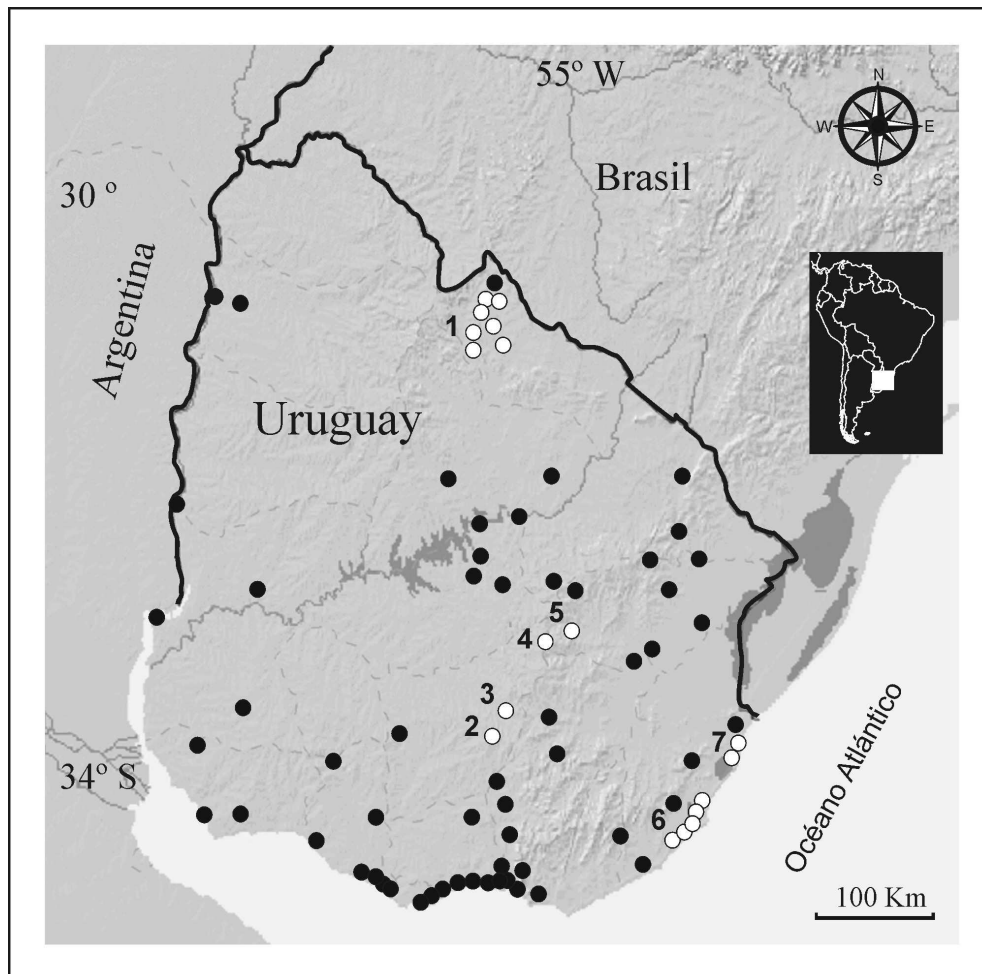
#### ***Physalaemus henselii***

Esta especie es nativa de Uruguay, el estado de Rio Grande do Sul en Brasil y unas pocas localidades en Argentina sobre el Río Uruguay (Barrio 1964; Barrasso 2014). Se examinaron 468 ejemplares adultos en colecciones. En Uruguay, la mayoría de los registros corresponden a distintas zonas del país entre 1941 y 1982, y no existen colectas entre 1984 y 2000. A partir de 2001 éstos provienen en tres zonas, serranías del Dpto. de Rivera en el norte, serranías del centro-este en la formación Cuchilla Grande, y planicies costeras del Dpto. de Rocha. En este último caso, entre los años 2001 y 2007 (n = 23) en su mayoría fueron realizados por el autor (n = 10; MNHN 9512, ZVCB 11180–11183, 15213, 17128–17131); algunas de las localidades fueron citadas en publicaciones previas (Kolenc *et al.* 2006; Borteiro & Kolenc 2007; Maneyro *et al.* 2008; Tomatis *et al.* 2009). Las distribuciones histórica y actual en Uruguay se indican en la figura 3.I, y el número de ejemplares colectados según el año se indica en la figura 3.II. La colecta histórica de ejemplares en Rio Grande do Sul mostró un perfil similar, fueron colectados principalmente entre 1953 y 1984, no existen ingresos entre 1985 y 1996, y hay unos pocos ejemplares colectados entre 2004 y 2012 (n = 25), ver figura 3.II.

**TABLA 3.I.** Localidades y muestreos realizados en el rango de distribución de *Physalaemus fernandezae* (*Pf*), *P. henselii* (*Ph*) y *Pleurodema bibroni* (*Plb*) en Uruguay (2000–2014).

Localidades	Registros <sup>1</sup>	Muestreos	Resultado <sup>2</sup>	Amenazas/Obs.
<b>Dpto. de Canelones</b>				
Arroyo Solís	<i>Pf, Ph</i>	1	X	Urbanización
Salinas	<i>Ph, Plb</i>	1	X	Urbanización
Atlántida, Parque del Plata, Las Toscas	<i>Ph, Plb</i>	11	X	Urbanización
Carrasco	<i>Ph, Plb</i>	1	X	Urbanización
Jaureguiberry	-----	4	<b><i>Plb</i> (1)</b>	Urbanización
Solymer	-----	4	X	Urbanización
Marindia	-----	2	X	Urbanización
<b>Dpto. de Cerro Largo</b>				
Aceguá	<i>Ph</i>	5	X	
Cuchilla de Mangrullo	-----	3	X	
Mazangano y alrededores	<i>Ph</i>	1	X	
Melo y alrededores	<i>Ph</i>	3	X	
Sierra de Vaz	<i>Ph</i>	1	X	
<b>Dpto. de Colonia</b>				
Santa Ana y alrededores	<i>Ph</i>	1	X	Urbanización
<b>Dpto. de Florida</b>				
Ruta 7 entre Fray Marcos y José Batlle y Ordóñez (aproximadamente 80 km)	<i>Plb</i>	12	<b><i>Ph</i> (1)</b>	
<b>Dpto. de Lavalleja</b>				
Aiguá	<i>Plb</i>	4	X	
Sierras de Minas	<i>Plb</i>	24	X	
<b>Dpto. de Maldonado</b>				
Sierra de las Ánimas	<i>Ph</i>	10	X	
Cerro Verdún	<i>Ph</i>	1	X	
Piriápolis, Cerro Pan de Azúcar	<i>Ph, Plb</i>	6	X	Urbanización
<b>Dpto. de Montevideo</b>				
Pajas Blancas y alrededores	<i>Ph</i>	12	X	Urbanización
Santiago Vázquez y alrededores	<i>Pf, Ph, Plb</i>	8	X	Urbanización
Malvín	<i>Plb</i>	1	X	Urbanización
<b>Dpto. de San José</b>				
Playa Penino y alrededores	<i>Ph, Plb</i>	6	X	Urbanización
Arazatí y alrededores	<i>Ph, Plb</i>	4	X	
Delta del Tigre	<i>Ph, Plb</i>	25	X	Urbanización
Sierra de Mahoma	<i>Ph</i>	5	X	
<b>Dpto. de Rivera</b>				
Ciudad de Rivera y alrededores	<i>Ph</i>	6	<b><i>Ph</i> (1)</b>	Forestación
<b>Dpto. de Rocha</b>				
Barra de Valizas	<i>Ph, Plb</i>	8	<b><i>Ph</i> (3), <i>Plb</i> (4)</b>	
Ciudad de Rocha y alrededores	<i>Ph</i>	3	X	Urbanización
La Coronilla, Cerro Verde	<i>Ph, Plb</i>	3	<b><i>Ph, Plb</i>(2)</b>	
Laguna de Rocha	-----	19	-----	<b><i>Plb</i><sup>3</sup></b>
La Paloma y alrededores	<i>Ph, Plb</i>	22	X	Urbanización
La Pedrera y Punta Rubia	<i>Plb</i>	21	X	Urbanización
Ruta 9 entre Castillos y La Coronilla	-----	4	<b><i>Ph</i> (2)</b>	
Ruta 10 entre Punta Rubia y Valizas	<i>Ph</i>	15	<b><i>Ph</i> (5), <i>Plb</i> (6)</b>	
Ruta 109 entre Rocha y Aiguá	-----	6	-----	
Santa Teresa y alrededores	<i>Plb</i>	5	<b><i>Ph</i> (2)</b>	Forestación
<b>Dpto. de Tacuarembó</b>				
Paso Aguiar y alrededores	-----	2	X	
<b>Dpto. de Treinta y Tres</b>				
Ciudad de Treinta y Tres	<i>Ph, Plb</i>	15	-----	<b><i>Plb</i><sup>4</sup></b>
Quebrada de los Cuervos y alrededores	<i>Plb</i>	20	X	
Valentines y Sierra del Tigre	-----	8	<b><i>Ph</i> (4), <i>Plb</i> (2)</b>	
<b>TOTAL</b>	41	33/41 (80,5 %)	313	10/41 (24,4 %)

<sup>1</sup> material en colecciones; <sup>2</sup> se indica el número de muestreo en que se detectó la especie; <sup>3</sup> un ejemplar colectado próximo a los sitios de muestreos (ver Kolenc *et al.* 2012); <sup>4</sup> registro acústico (Kolenc *et al.* 2009).



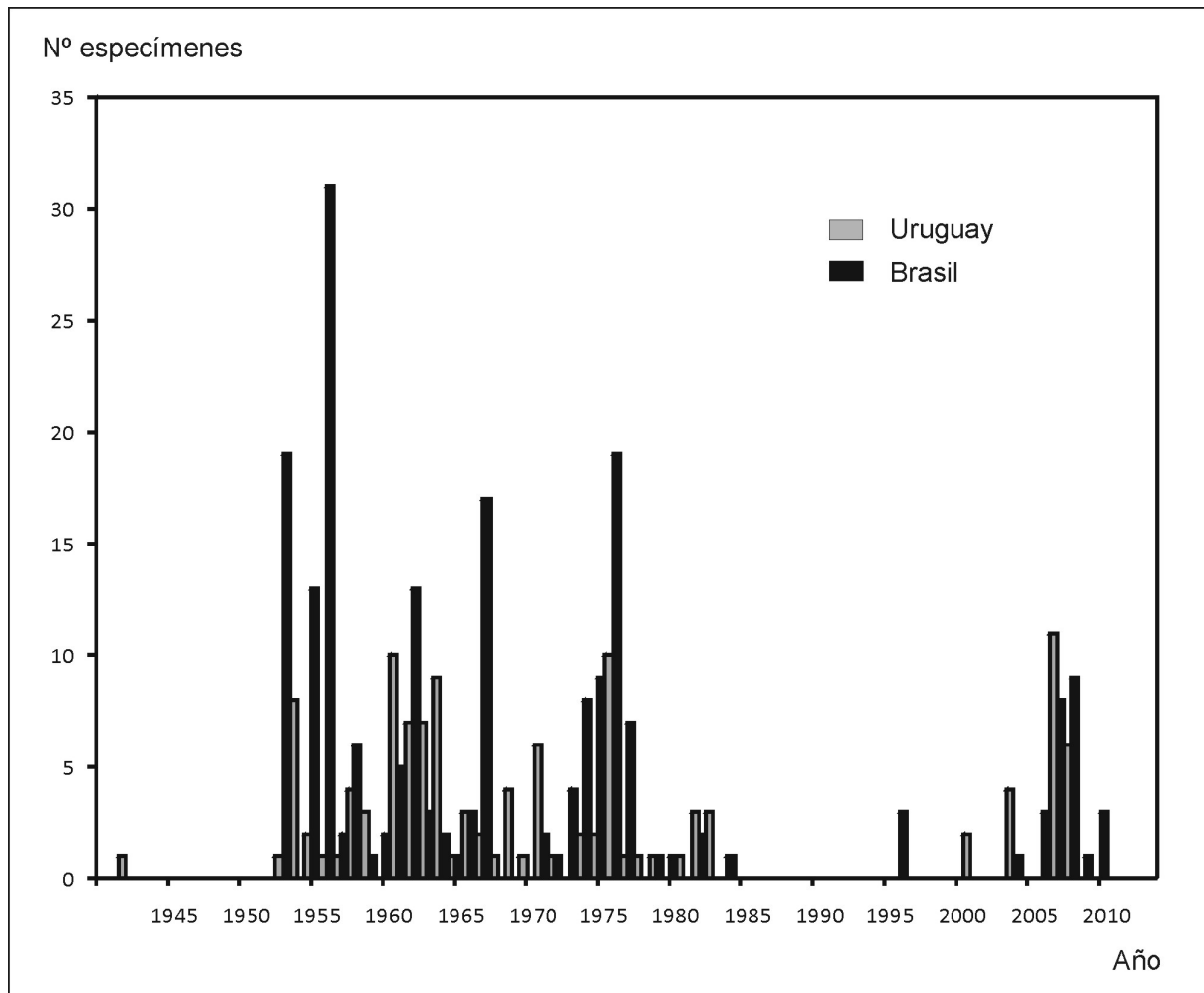
**FIGURA 3.I.** Distribución geográfica de *Physalaemus henselii* en Uruguay. Los puntos corresponden a registros en colecciones y los círculos a poblaciones actuales: 1, serranías de la Cuchilla Negra; 2–5, poblaciones en sierras de la Cuchilla Grande (Ruta 7, km 138 y 139, km 154, Valentines y Sierra del Tigre respectivamente); zonas costera entre Oceanía del Polonio (6) y La Coronilla (7).

### *Pleurodema bibroni*

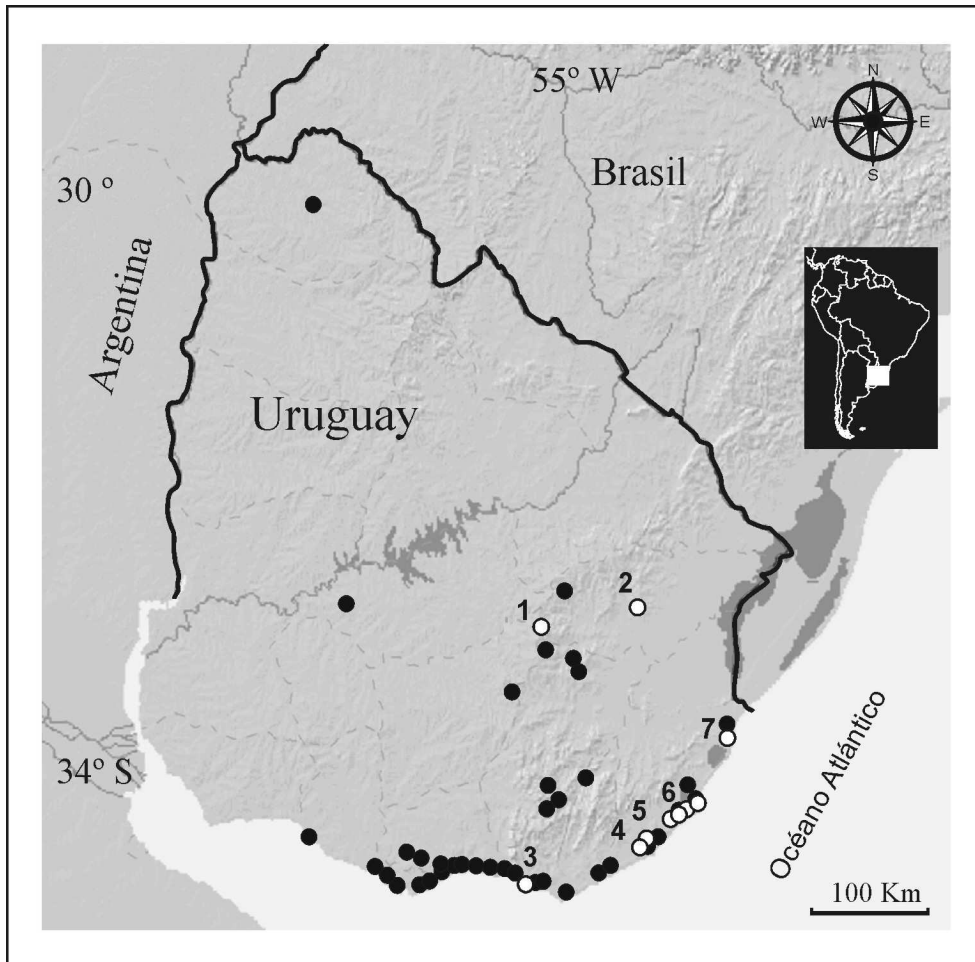
El rango de distribución histórico de esta especie en tiempos recientes corresponde a una amplia región en el sur de Uruguay y una pequeña zona del sureste de Brasil, en los estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina y Paraná (Braun 1973; Barrio 1977; Kolenc *et al.* 2009; Lignau 2009; Trein *et al.* 2014). Una serie de ejemplares colectados en 1893–1894 en el Río Apa, Paraguay, depositados en el Museo de Zoología de la Universidad de Turín, MZUT An447 (1–7) y considerados como *Physalaemus fuscomaculatus* (ver Cei 1990) fueron examinados durante la realización de este trabajo. De acuerdo a sus caracteres morfológicos se asignaron a *Pleurodema bibroni* (Kolenc *et al.* 2011). La declinación de *Pl. bibroni* en



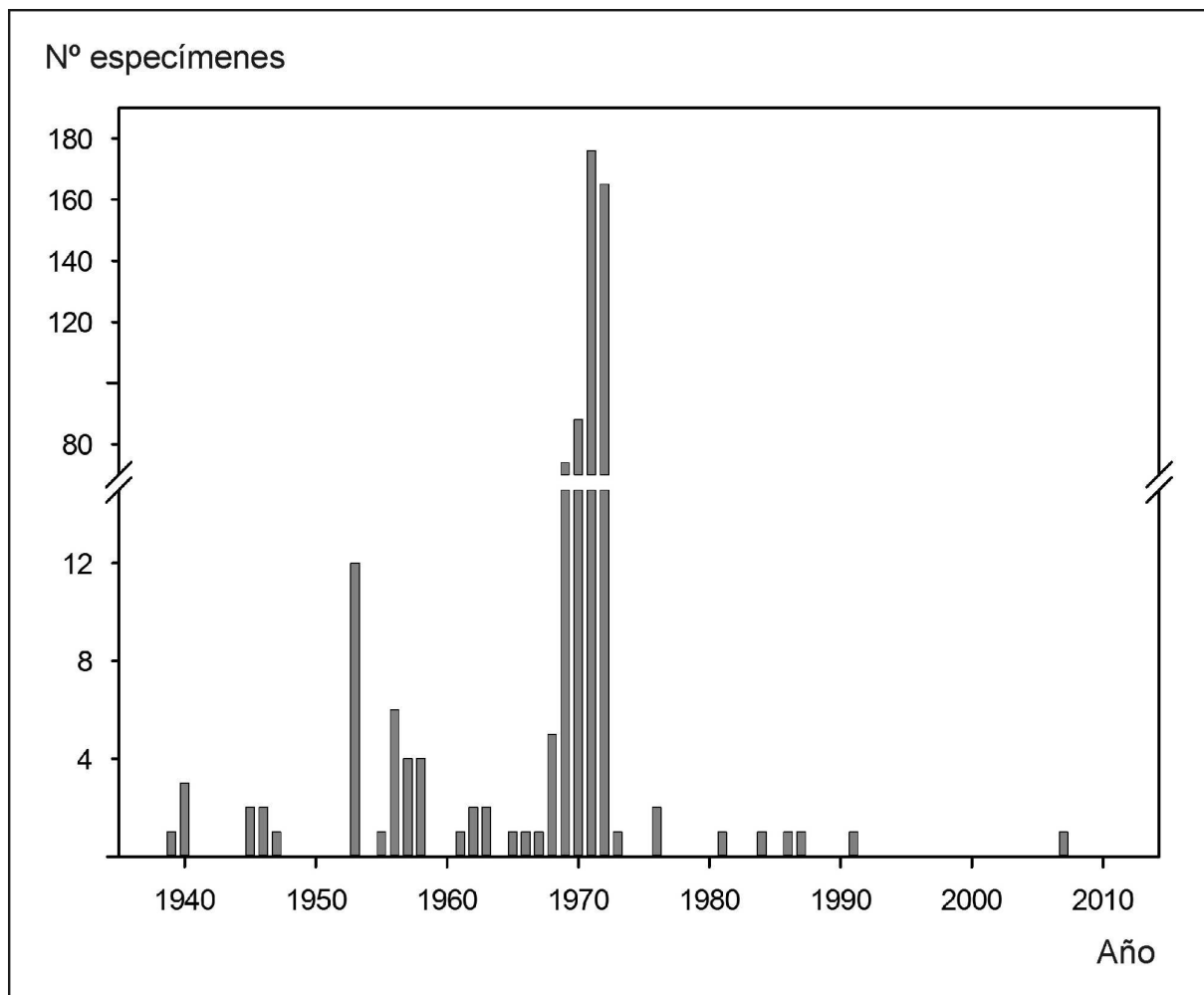
Uruguay, donde la especie era muy común, ya fue presentada en un trabajo previo (Kolenc *et al.* 2009). Un elevado número de ejemplares en colecciones fue colectado a fines de los años 1960s y principios de los años 1970s asociado a los estudios de Avelino Barrio (Kolenc *et al.* 2009). El hallazgo de esta especie se volvió una rareza a partir de los años 1970s, con escasas colectas durante más de 30 años y pocas poblaciones actuales conocidas, figuras 3.III y 3.IV.



**FIGURA 3.II.** Especímenes de *Physalaemus henselii* de Uruguay y sur de Brasil (estado de Rio Grande do Sul) presentes en las colecciones herpetológicas estudiadas, colectados entre 1930 y 2010.



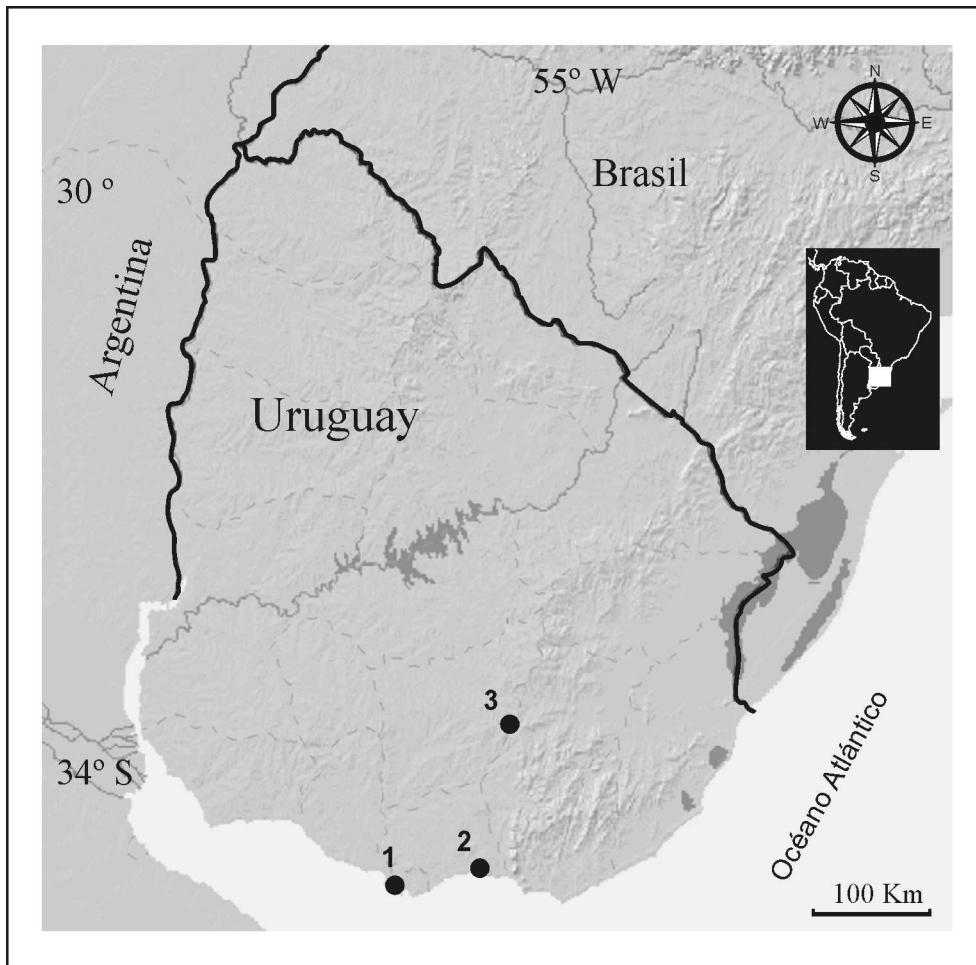
**FIGURA 3.III.** Distribución geográfica de *Pleurodema bibroni* en Uruguay. Los puntos corresponden a localidades conocidas en base a registros en colecciones. Los círculos indican poblaciones actuales detectadas en este estudio o reportadas en publicaciones recientes: 1, Valentines; 2, Ciudad de Treinta y Tres (Kolenc *et al.* 2009); 3, Jaureguiberry; 4, Laguna de las Nutrias; 5, Refugio de fauna Laguna de Castillos (Kolenc *et al.* 2009); 6, 7, poblaciones entre Oceanía del Polonio y La Coronilla (Kolenc *et al.* 2009; Natale & Maneyro 2008).



**FIGURA 3.IV.** Especímenes de *Pleurodema bibroni* procedentes de Uruguay presentes en las colecciones herpetológicas estudiadas, según año de colecta. Gráfico adaptado de Kolenc *et al.* (2009).

### *Physalaemus fernandezae*

Su rango de distribución se encuentra casi totalmente en la Provincia de Buenos Aires, Argentina (Barrio, 1964), donde es abundante y de hallazgo común (Barrasso 2014; D. Barrasso, com. pers.). Barrio (1964) indicó su presencia en Uruguay sobre el Río de la Plata hacia el este hasta Solís, Dpto. de Canelones. Dicho autor colectó 41 de los 43 ejemplares provenientes de Uruguay presentes en colecciones (CENAI 122, n = 39; CENAI 156/1, 3261). Existe además un solo registro hacia el interior, en los alrededores de Cerro Colorado, Dpto. de Florida (Núñez *et al.* 2004), MNHN 1164. No se colectan ejemplares en el país desde 1962. La distribución geográfica en Uruguay se muestra en la figura 3.V.



**FIGURA 3.V.** Distribución geográfica de *Physalaemus fernandezae* en Uruguay. Localidades: 1, Santiago Vázquez; 2, Arroyo Solís; 3, Cerro Colorado.

## Referencias

- Barrasso, D.A. (2014) Estructura poblacional y filogeografía de *Physalaemus fernandezae* y *P. henselii* (Amphibia: Anura). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, 151 p.
- Barrio, A. (1964) Relaciones morfológicas, etoecológicas y zoogeográficas entre *Physalaemus henselii* (Peters) y *P. fernandezae* (Müller) (Anura, Leptodactylidae). *Acta Zoológica Lilloana*, 20, 285–305.
- Barrio, A. (1977) Aportes para la elucidación del “status” taxonómico de *Pleurodema bibroni* Tschudi y *Pleurodema kriegi* (Müller) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). *Physis*, 37, 311–331.
- Borteiro, C. & Kolenc, F. (2007) Redescription of the tadpoles of three species of frogs from Uruguay (Amphibia: Anura: Leiuperidae and Leptodactylidae), with notes on natural history. *Zootaxa*, 1638, 1–20.
- Braun, C.A.S (1973) Sobre a ocorrência de *Pleurodema bibroni* Tschudi, 1838 no estado do

- Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia (Zoologia)*, 44, 28–31.
- Cei, J.M. (1990) On a Paraguayan sample of a long time confused species: *Physalaemus fuscomaculatus* (Steindachner, 1864) (Anura, Leptodactylidae). *Bolletino del Museo Regionale di Scienze Naturali (Torino)*, 8, 215–231.
- Kolenc, F., Borteiro, C., Tedros, M., Núñez, D. & Maneyro, R. (2006) The tadpole of *Physalaemus henselii* (Peters) (Anura: Leiuperidae). *Zootaxa*, 1360, 41–50.
- Kolenc, F., Borteiro, C., Baldo, D., Ferraro, D. & Prigioni, C. (2009) The tadpoles and advertisement calls of *Pleurodema bibroni* Tschudi and *Pleurodema kriegi* (Müller), with notes on their geographic distribution and conservation status (Amphibia, Anura, Leiuperidae). *Zootaxa*, 1969, 1–35.
- Kolenc, F., Borteiro, C., González, E.M., Barrasso, D. & Prigioni, C. (2012) Recent findings of the declining frog *Pleurodema bibroni* Tschudi, 1838 (Anura: Leiuperidae) in Uruguay. *Herpetology Notes*, 5, 181–183.
- Kolenc, F., Baldo, D., Borteiro, C., Marangoni, F., Ferraro, D.P. & Faivovich, J. (2011) The identity of *Eupemphix fuscomaculatus* Steindachner, 1864 (Amphibia: Anura). *Copeia*, 2011(4), 513–522.
- Lignau, R. (2009) Distribuição temporal, atividade reprodutiva e vocalizações em uma assembleia de anfíbios anuros de uma floresta ombrófila mista em Santa Catarina, sul do Brasil. Tesis Doctoral, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 94 p.
- Maneyro, R., Núñez, D., Borteiro, C., Tedros, M. & Kolenc, F. (2008) Advertisement call and female sexual cycle in Uruguayan populations of *Physalaemus henselii* (Anura, Leiuperidae). *Iheringia (Zoologia)*, 98(2), 210–214.
- Natale, G.S. & Maneyro, R. (2008) Amphibia, Anura, Leiuperidae, *Pleurodema bibroni*: Rediscovery. *Check List*, 4(1), 47–49.
- Núñez, D., Maneyro, R., Langone, J. & de Sá, R.O. (2004) Distribución geográfica de la fauna de anfíbios del Uruguay. *Smithsonian Herpetological Information Service*, 134, 1–34.
- Tomatis, C., Baldo, D., Kolenc, F. & Borteiro, C. (2009) Chromosomal variation in the species of the *Physalaemus henselii* group (Anura: Leiuperidae). *Journal of Herpetology*, 43(3), 555–560.
- Trein, F.L., Lima, L.P., Ulandowski, L.K.A. & Morato, S.A.A. (2014) *Pleurodema bibroni* Tschudi, 1838 (Anura: Leiuperidae): distribution extension and first record for the state of Paraná, Brazil. *Check List*, 10(2), 417–418.

**Apéndice 4.** Anfibios encontrados muertos o moribundos durante muestreos de campo en Uruguay (2000–2014).

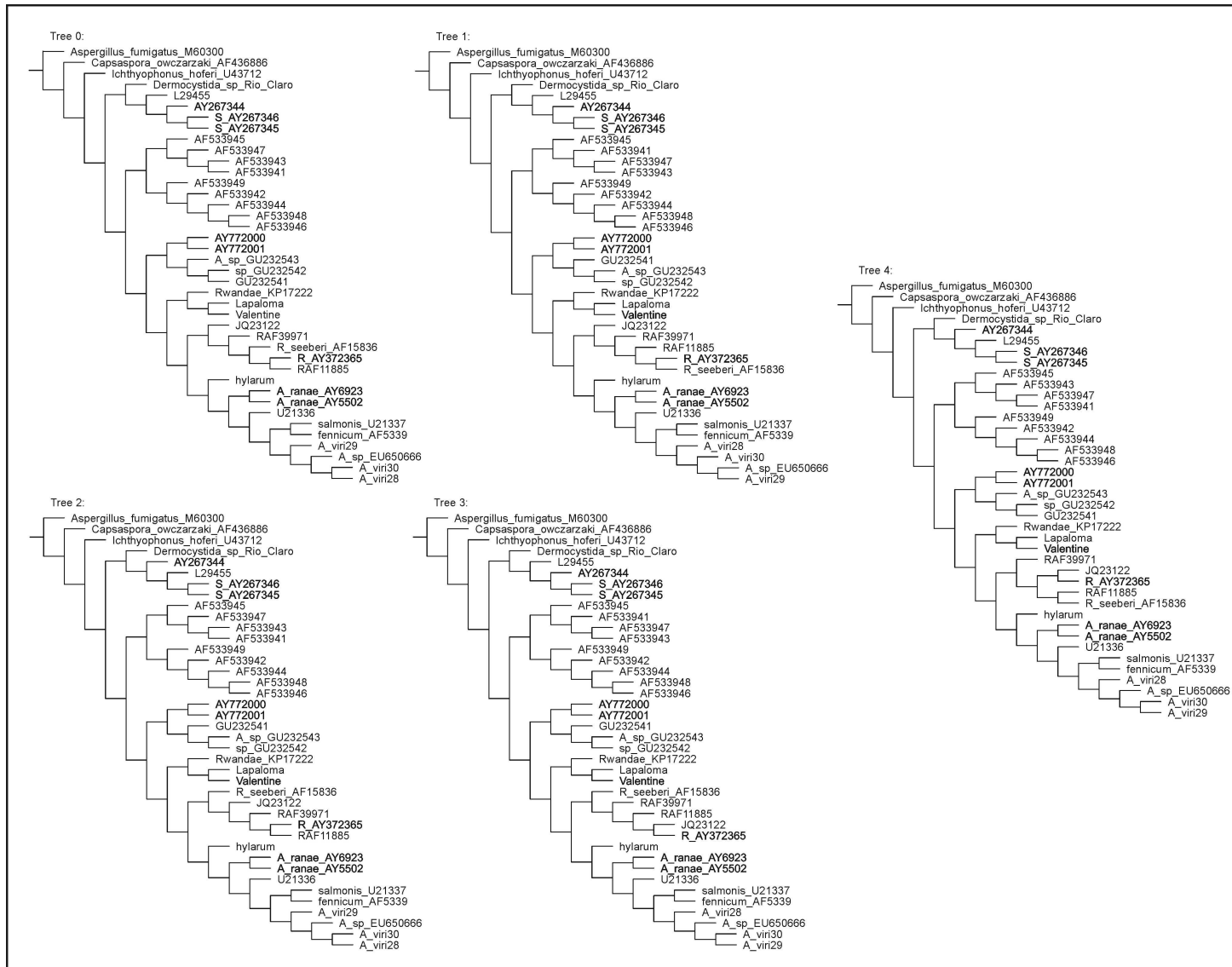
Especie	Localidad	Fecha	Observaciones
<i>Leptodactylus gracilis</i>	Laguna de Rocha, Dpto. de Rocha	15/VIII/2010	Hembra hallada muerta deshidratada en dunas costeras.
<i>Leptodactylus latinasus</i>	Barra de Valizas, Dpto. de Rocha	1/V/2007	Subadulto bajo tronco, en descomposición.
<i>Leptodactylus latrans</i>	Santiago Vázquez, Dpto. de Montevideo	28/XI/2009	Macho en descomposición avanzada, en margen de cuerpo de agua temporal.
<i>Physalaemus gracilis</i>	Ruta 109 próximo a ciudad de Rocha, Dpto. de Rocha	8/X/2006	Hembra moribunda flotando en orilla de charco temporal durante el día, apenas móvil. Histología de piel sin indicios de quitridiomycosis.
<i>Physalaemus henselii</i>	Barra de Valizas, Dpto. de Rocha	23/IX/2007	Hembra en descomposición, bajo tronco.
<i>Odontophrynus americanus</i>	Delta del Tigre, Dpto. de San José	7/II/2014	Hembra muerta flotando en charco temporal, durante explosión reproductiva luego de lluvias.
<i>Pseudis minutus</i>	Cerro Cueva del Tigre, Sierra de las Ánimas, Dpto. de Maldonado	8/IX/2013	Macho en descomposición en el fondo de charco temporal, luego de fuertes lluvias.

Se excluyen anfibios muertos por vehículos en caminos y carreteras.



**FIGURA 4.I.** Anfibios encontrados muertos en condiciones naturales en Uruguay. **A**, *Odontophrynus americanus*, Delta del Tigre, Dpto. de San José (7/II/2014). **B**, *Pseudis minutus*, Sierra de las Ánimas, Dpto. de Maldonado (8/IX/2013).

## Apéndice 5. Árboles obtenidos en el análisis filogenético de Dermocystida.



## Apéndice 6. Distancias genéticas en Dermocystida.

Secuencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
1 AY267345	-																																					
2 AY267346	0,06	-																																				
3 AY267344	0,23	0,17	-																																			
4 L29455	0,34	0,29	0,34	-																																		
5 KU982985	2,58	2,50	2,66	2,82	-																																	
6 AY550245	5,21	5,15	5,21	5,32	5,59	-																																
7 AY692319	5,09	5,03	5,09	5,21	5,36	0,57	-																															
8 EF493029	5,78	5,63	5,93	5,63	5,59	2,12	1,40	-																														
9 EU650666	4,87	4,81	4,87	5,01	5,10	1,95	1,83	-	-																													
10 EF493028	5,41	5,27	5,55	5,27	5,24	1,99	1,32	-	-	-	-																											
11 EF493030	5,41	5,27	5,55	5,27	5,24	1,99	1,32	-	-	-	-																											
12 AF533950	4,77	4,71	4,77	4,88	4,78	2,13	2,02	0,84	1,11	0,79	0,79	-																										
13 KU982982	5,20	5,12	5,27	5,45	4,86	1,77	1,55	0,98	1,02	0,92	0,92	0,88	-																									
14 U21337	5,19	5,13	5,19	5,31	5,26	2,15	2,04	1,12	1,53	1,05	1,05	0,63	1,17	-																								
15 KU982984	5,17	5,03	5,31	5,04	4,87	3,16	2,35	1,71	1,56	1,60	1,60	1,43	1,56	1,96	-																							
16 KU982983	4,88	4,81	4,95	5,11	4,71	2,79	2,58	1,69	1,87	1,59	1,87	1,59	2,01	1,77	2,44	-	-																					
17 KP172222	4,81	4,73	4,88	5,05	4,76	2,69	2,48	1,41	1,76	1,32	1,32	1,90	1,72	2,26	0,26	0,21	-																					
18 U21336	4,96	4,89	4,96	5,07	5,02	2,43	2,31	1,83	1,47	1,72	1,72	1,55	1,39	1,98	1,95	2,01	1,83	-																				
19 AF158369	4,80	4,74	4,80	4,92	4,78	1,93	1,81	0,98	1,03	0,92	0,92	1,32	0,95	1,75	1,03	1,24	1,19	1,50	-																			
20 AF118851	4,65	4,59	4,65	4,76	4,78	1,90	1,79	0,98	1,00	0,92	0,92	1,38	0,95	1,68	1,03	1,24	1,19	1,61	-	-																		
21 AY372365	4,65	4,59	4,65	4,78	4,78	1,91	1,80	0,98	1,00	0,92	0,92	1,38	0,95	1,69	1,03	1,24	1,19	1,61	-	-	-																	
22 AF399715	4,59	4,53	4,59	4,70	4,79	1,85	1,73	0,98	1,00	0,92	0,92	1,32	0,95	1,69	1,04	1,24	1,19	1,55	-	0,06	0,06	-																
23 JQ231220	4,49	4,18	4,18	4,19	4,50	4,13	2,62	2,03	2,03	2,03	2,03	2,32	2,03	2,92	1,72	1,72	1,72	2,03	0,86	0,86	0,86	0,86	-															
24 GU232541	6,65	6,51	6,64	7,08	5,44	4,85	4,47	4,83	3,94	4,83	4,83	3,82	3,69	3,81	5,97	4,71	4,58	4,33	3,94	3,94	3,94	3,94	3,94	3,21	-													
25 GU232542	6,87	6,75	6,87	7,29	5,58	4,88	4,52	4,71	3,89	4,71	4,71	3,77	3,65	3,76	5,78	4,62	4,50	4,38	3,76	3,76	3,76	3,76	3,77	3,21	-	-												
26 GU232543	6,77	6,64	6,77	7,19	5,48	4,78	4,42	4,57	3,79	4,57	4,57	3,79	3,67	3,78	5,64	4,52	4,40	4,28	3,78	3,78	3,78	3,78	3,79	3,21	-	-	-											
27 AY772001	7,97	7,90	8,04	8,25	6,93	6,93	6,72	7,27	6,44	6,80	6,80	6,20	5,98	6,71	5,82	6,35	6,54	6,47	6,33	6,33	6,28	6,40	6,30	7,21	7,28	7,18	-											
28 AY772000	7,83	7,75	7,90	8,11	6,93	6,93	6,72	7,27	6,44	6,80	6,80	6,20	5,98	6,71	5,82	6,35	6,54	6,47	6,33	6,33	6,29	6,41	6,30	7,21	7,28	7,18	0,45	-										
29 AF533941	8,69	8,62	8,69	8,80	7,83	7,74	7,62	6,58	7,15	6,17	6,17	6,97	6,42	7,34	7,07	7,23	7,35	7,15	7,44	7,30	7,32	7,24	9,24	7,17	7,23	7,13	11,01	11,24	-									
30 AF533943	8,82	8,76	8,82	8,94	8,00	7,87	7,75	6,74	7,28	6,31	6,31	7,10	6,58	7,47	7,22	7,38	7,51	7,22	7,58	7,43	7,45	7,36	9,24	7,30	7,36	7,26	11,24	11,47	0,22	-								
31 AF533945	8,62	8,55	8,62	8,73	7,83	7,61	7,49	6,58	7,15	6,16	6,16	6,97	6,50	7,41	7,07	7,30	7,42	7,15	7,44	7,29	7,32	7,23	8,90	7,43	7,49	7,39	11,01	11,24	0,22	0,33	-							
32 AF533947	8,81	8,75	8,81	8,93	8,00	7,98	7,86	7,04	7,40	6,59	6,59	7,22	6,74	7,60	7,50	7,53	7,65	7,40	7,70	7,54	7,57	7,48	9,56	7,56	7,73	7,63	11,31	11,54	0,33	0,44	0,44	-						
33 AF533949	8,75	8,69	8,75	8,87	7,75	7,80	7,68	6,28	7,22	5,88	5,88	6,91	6,51	7,35	6,79	7,31	7,43	7,21	7,51	7,36	7,39	7,30	8,90	7,31	7,37	7,27	11,10	11,33	0,39	0,50	0,39	0,61	-					
34 AF533942	8,77	8,70	8,77	8,89	7,91	7,73	7,61	6,13	7,12	5,74	5,74	6,89	6,50	7,27	6,64	7,08	7,19	7,07	7,37	7,22	7,25	7,22	8,90	7,31	7,24	7,14	10,78	11,01	0,62	0,73	0,62	0,84	0,56	-				
35 AF533946	8,94	8,88	8,94	9,06	8,00	7,73	7,61	6,43	7,40	6,03	6,03	7,08	6,66	7,34	6,93	7,38	7,50	7,20	7,57	7,41	7,44	7,35	9,24	6,91	6,85	6,76	11,30	11,53	1,72	1,84	1,84	1,95	1,78	1,58	-			
36 AF533948	8,95	8,88	8,94	9,06	7,84	7,73	7,61	6,13	7,33	5,74	5,74	7,09	6,50	7,34	6,65	7,23	7,35	7,20	7,50	7,41	7,44	7,35	8,60	6,65	6,61	6,51	11,15	11,38	1,73	1,84	1,84	1,95	1,78	1,53	0,22	-		
37 AF533944	8,81	8,75	8,81	8,93	7,92	7,66	7,54	6,43	7,08	6,02	6,02	6,77	6,50	7,02	6,93	7,15	7,27	6,95	7,37	7,22	7,25	7,16	9,57	7,17	7,10	7,01	10,94	11,16	0,94	1,05	1,05	1,16	1,00	0,79	0,88	0,89		

Taxones: 1–4, *Sphaerothecum destruens*; 5, *Sphaerothecum* sp. nov., Rio Claro, Brasil; 6, 7, *Rhinosporidium ranae*; 8, 10, 11, *Rhinosporidium viridescens*; 9, *Rhinosporidium viridescens* (Di Rosa & Fagotti, no publicado); 12, *Rhinosporidium fennicum*; 13, *Rhinosporidium hylarum*; 14, *Rhinosporidium salmonis*; 15, *Rhinosporidium rwandae*, Valentines, Uruguay; 16, *Rhinosporidium rwandae*, La Paloma, Uruguay; 17, *Rhinosporidium rwandae*; 18, *Rhinosporidium* sp. (Ragan *et al.* 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93, 11907–11912); 19–23, *Rhinosporidium seeberi*; 24–26, *Dermocystidium pusula* (González-Hernández *et al.* 2010, *Parasitol. Int.*, 59, 344–350); 27, 28, *Amphibiothecum penneri*; 29–37, *Dermothecha percae*. En gris se indican las nuevas secuencias producidas en este estudio



**Apéndice 7.** Anfibios examinados en sitios con infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*. Abreviaturas: LP, La Paloma; LR, Laguna de Rocha; VA, Valentines.

Especie	Localidad y fecha	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Total
<i>Dendropsophus sanborni</i>	LP 10/II/2007	----	----	----	0/5	0/9
	LR 12/VIII/2011	----	0/3	----	----	
	LR 9/XI/2013	----	----	0/1	----	
<i>Julianus uruguayus</i>	LP 11/VIII/2011	----	0/14	----	----	0/14
<i>Leptodactylus latrans</i>	LP 5/II/2014	----	----	----	0/2	0/3
	LR 17/IV/2013	0/1	----	----	----	
<i>Melanophryniscus montevidensis</i>	LR 7/VIII/2006	----	0/4	----	----	0/21
	LR 8/X/2006	----	----	0/2	----	
	LR 29/II/2008	----	----	----	0/13	
	LR 11/8/2011	----	0/2	----	----	
<i>Odontophrynus americanus</i>	LP 6/V/2007	0/3	----	----	----	0/4
	LP 11/VIII/2011	0/1	----	----	----	
<i>Odontophrynus maisuma</i>	LR 14/VIII/2006	----	0/4	----	----	0/5
	LR 12/VIII/2011	----	0/1	----	----	
<i>Physalaemus gracilis</i>	LR 29/IX/2012	----	----	0/1	----	0/1
<i>Pseudis minutus</i>	LP 28/XI/2002	----	----	0/1	----	0/42
	LP 10/II/2007	----	----	----	0/2	
	LP 1/V/2007	----	0/2	----	----	
	LR 1/V/2007	----	0/3	----	----	
	LR 11/VIII/2011	----	0/7	----	----	
	LR 17/IV/2013	0/24	----	----	----	
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	LP 11/VIII/2011	----	0/1	----	----	0/6
	LP 29/IX/2012	----	----	0/1	----	
	LP 9/XI/2013	----	----	0/2	----	
<i>Rhinella arenarum</i>	LR 8/X/2006	----	----	0/2	----	0/1
	LP 1/II/2006	----	----	----	0/1	
	LP 1/V/2006	0/1	----	----	----	
<i>Rhinella dorbignyi</i>	LP 8/X/2006	----	----	0/1	----	0/10
	LP 5/II/2014	----	----	----	0/1	
	LR 7/VIII/2006	----	0/1	----	----	
	LR 8/X/2006	----	----	0/1	----	
	LR 1/V/2007	0/1	----	----	----	
<i>Scinax squalirostris</i>	LR 11/VIII/2011	----	0/4	----	----	0/20
	LP 5/III/2088	----	----	----	0/2	
	LP 2/8/2013	----	0/1	----	----	
	LR 12/VIII/2011	----	0/11	----	----	
	LR 29/IX/2012	----	----	0/6	----	
Sub-total LP/LR		0/34	0/58	0/17	0/26	0/136
<i>Elachistocleis bicolor</i>	VA 1/XI/2009	----	----	0/2	----	0/2
<i>Julianus uruguayus</i>	VA 1/XI/2009	----	----	0/25	----	0/25
<i>Melanophryniscus sanmartini</i>	VA 5/VII/2009	----	0/2	----	----	0/3
	VA 2/VIII/2009	----	0/1	----	----	
<i>Odontophrynus americanus</i>	VA 15/VI/2012	----	0/3	----	----	0/3
<i>Physalaemus biligonigerus</i>	VA 1/XI/2009	----	----	0/18	----	0/20
	VA 29/X/2012	----	----	0/2	----	
<i>Pleurodema bibroni</i>	VA 5/VII/2009	----	0/2	----	----	0/3
	VA 15/VI/2012	----	0/1	----	----	
<i>Pseudis minutus</i>	VA 2/VIII/2009	----	0/1	----	----	0/4
	VA 5/IX/2009	----	0/1	----	----	
	VA 1/XI/2009	----	----	0/2	----	
<i>Pseudopaludicola falcipes</i>	VA 5/VII/2009	----	0/1	----	----	0/4
	VA 5/IX/2009	----	0/1	----	----	
	VA 1/XI/2009	----	----	0/2	----	
<i>Scinax granulosus</i>	VA 1/XI/2009	----	----	0/3	----	0/3
Sub-total VA		----	0/13	0/54	----	0/67
TOTAL		0/34	0/71	0/71	0/26	0/203

**Apéndice 8.** Resumen de los diagnósticos realizados en anfibios de Uruguay y sur de Brasil.

Taxón	Agente infeccioso/hallazgo patológico	Observaciones
<i>Ceratophrys ornata</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Cautiverio, haplotipo UyIII
<i>Dendropsophus sanborni</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	
	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	haplotipo UyI, UyIII
	<i>Rhinosporidium rwandae</i>	
	<i>Ichthyophonus</i> sp.	
<i>Hypsiboas pulchellus</i>	<i>Spirometra</i> sp.	Larva pleroceroide ( <i>Sparganum</i> )
	<i>Hannemania</i> sp.	
	melanoforomas	
<i>Julianus uruguayus</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	haplotipo UyIII
<i>Leptodactylus latrans</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	
	<i>Hannemania</i> sp.	
<i>Limnomedusa macroglossa</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	
<i>Lithobates catesbeianus</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Poblaciones silvestres y criadero, haplotipo UyIII
	Hiperpigmentación anómala de la piel	
<i>Melanophryniscus sanmartini</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	haplotipo UyI
	lipoma	
<i>Odontophrynus americanus</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	haplotipo UyI
<i>Physalaemus henselii</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	haplotipo UyI, UyIII
<i>Pleurodema bibroni</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	haplotipo UyI, UyII, UyIII
<i>Pseudis minutus</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	
<i>Rhinella arenarum</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	haplotipo UyI
<i>Scinax fuscovarius</i>	<i>Rhinosporidium hylarum</i>	Rio Claro, São Paulo, Brasil
	<i>Sphaerothecum</i> sp.	
<i>Scinax granulatus</i>	<i>Hannemania</i> sp.	
<i>Scinax squalirostris</i>	<i>Hannemania</i> sp.	
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Cautiverio, haplotipo UyIII

Las muestras corresponden a especímenes de anfibios de Uruguay, salvo indicación.

## Apéndice 9. Publicaciones.

### Publicación parcial de resultados (2012–2015):

- Borteiro, C., Verdes, J.M., Cruz, J.C., Sabalsagaray, M.J., Kolenc, F., Martínez Debat, C. & Ubilla, M. (2015) *Ichthyophonus* sp. (Ichthyophonae, Ichthyophonida) infection in a South American amphibian, the hylid frog *Hypsiboas pulchellus*. *Journal Wildlife Diseases*, 51(2), 530–533.
- Borteiro, C., Castro, O., Sabalsagaray, M.J., Kolenc, F., Martínez Debat, C. & Ubilla, M. (2015) Spargana in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) from Uruguay. *Northwestern Journal of Zoology*, 11(1), 171–173.
- Borteiro, C., Cruz, J.C., Kolenc, F., Verdes, J.M., Moraña, A., Martínez Debat, C., Kun, A., Ubilla, M. & Okada, K. (2014) Dermocystid-chytrid coinfection in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *Journal of Wildlife Diseases*, 50(1), 150–153.
- Kolenc, F., Borteiro, C., González, E.M., Barrasso, D. & Prigioni, C. (2012) Recent findings of the declining frog *Pleurodema bibroni* Tschudi, 1838 (Anura: Leiuperidae) in Uruguay. *Herpetology Notes*, 5, 181–183.
- Borteiro, C., Baldo, D., Baêta, D., Fares Sabbag, A., Kolenc, F., Martínez-Debat, C., Ubilla, M., Haddad, C.F.B., Cruz, J.C. & Verdes, J.M. Amphibian parasites of the Order Dermocystida (Ichthyosporae) from South America: current knowledge, taxonomic review and new records from Brazil. (en preparación).
- Oda, F.H., Borteiro, C., da Graça, R.J., Tavares, L.E., Batista, V.G., de Lima, F.S., Bellay, S., Karling, L.C., Pavanelli, C.S., Pavanelli, G.C. & Takemoto, R.M. Current knowledge on sparganosis in amphibians and reptiles from South America with new records from Brazil. (en preparación)

## Otras publicaciones durante el transcurso de este estudio (2010–2016):

- Cardozo, D., Boeris, J., Ferro, J.M., Borteiro, C., Kolenc, F., Suárez, P., Netto, F., Brusquetti, F. & Baldo, D. (2016) Evidence for independent instances of chromosome number reduction in the genus *Pseudopaludicola* (Anura: Leptodactylidae). *Salamandra*, 52(1), 11–22.
- Borteiro, C., Kolenc, F. & Prigioni, C. (2015) A new noteworthy record of *Phrynops williamsi* Rhodin & Mittermeier (Testudines, Chelidae) in Uruguay. *Cuadernos de Herpetología*, 29(1), 95–96.
- Borteiro, C., Baldo, D., Kunz, T.S., Perez, R., Eltz, R.P. & Kolenc, F. (2014) Contracting behaviour in three species of *Phyllomedusa* (Anura: Hylidae: Phyllomedusinae). *Herpetology Notes*, 7, 393–395.
- Borteiro, C., Kolenc, F. & Verdes, J.M. (2014) Aggregative behaviour in the fossorial lizard *Amphisbaena darwini* (Squamata, Amphisbaenidae). *Cuadernos de Herpetología*, 27(1), 57–58.
- Baldo, D., Vera Candiotti, F., Haad, B., Kolenc, F., Borteiro, C., Pereyra, M., Zank, C., Colombo, P., Bornschein, M.R., Brusquetti, F., Conte, C.E., Nogueira Costa, P., Almeida Santos, P. & Pie, M.R. (2014) Comparative morphology of pond, stream and phytotelm-dwelling tadpoles of the South American Redbelly Toads (Anura: Bufonidae: *Melanophryniscus*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 112, 417–441.
- Borteiro, C., Kolenc, F., Prigioni, C., Lyra, M. & Baldo, D. (2013) A lost species or the loss of stripes? The case of *Contomastix* lizards from Cabo Polonio, Uruguay, with observations on *C. lacertoides* (Duméril & Bibron) and *Cnemidophorus grandensis* Cope (Squamata, Teiidae). *Zootaxa*, 3620, 245–259.
- Arrieta, D., Borteiro, C., Kolenc, F. & Langone, J.A. (2013) Anfibios. En: *Especies prioritarias para la conservación en el Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares*. Sistema Nacional de Áreas Protegidas, Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, Montevideo, pp. 114–127.
- Gobel, N., Cortizas, S., Mautone, J.M., Borteiro, C. & Laufer, G. (2013) Predation of *Pseudis minuta* Günther 1858, by *Lethocerus annulipes* (Herrich-Schaeffer 1845). *Cuadernos de Herpetología*, 27(1), 63.
- Kolenc, F., Borteiro, C., Cotichelli, L., Martínez, C., Vera Candiotti, M.F. & Baldo, D. (2013) The tadpole and karyotype of *Rhinella achavali* (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 47(4), 599–606.
- Laufer, G., Pereyra, L.C., Akmentins, M. & Borteiro, C. (2013) A comment on the oral dermal flaps of *Elachistocleis* Parker, 1927 (Anura: Microhylidae) larvae. *Zootaxa*, 3710, 498–500.
- Prigioni, C., Borteiro, C., Kolenc, F., Colina, M. & González, E.M. (2013) Geographic distribution and apparent decline of *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti 1768; Serpentes, Viperidae) in Uruguay. *Cuadernos de Herpetología*, 27(2), 163–165.

- Baldo, D., Borteiro, C., Kolenc, F., Rosset, S., Prigioni, C. & Martínez Debat, C. (2012) The taxonomic status of *Melanophryniscus orejasmirandai* Prigioni & Langone, 1987 '1986' (Anura: Bufonidae). *Zootaxa*, 3235, 45–61.
- Baldo, D., Cotichelli, L., Pereyra, M., Borteiro, C., Netto, F., Kolenc, F., Brusquetti, F. & Bidau, C. (2012) A cytogenetic survey of the genus *Melanophryniscus* Gallardo, 1961 (Anura: Bufonidae). *Journal of Herpetology*, 46(1), 25–32.
- Pereyra, M., Borteiro, C., Baldo, D., Kolenc, F. & Conte, C.E. (2012) Advertisement call of the cryptic species *Scinax aromothyella* (Faivovich 2005) and *S. berthae* (Barrio 1962) with comments on the complex calling in the *S. catharinae* group. *Herpetological Journal*, 22(2), 133–137.
- Alcalde, L., Vera Candiotti, M.F., Kolenc, F., Borteiro, C. & Baldo, D. (2011) Cranial anatomy of tadpoles of five species of *Scinax* (Hylidae, Hylinae). *Zootaxa*, 2787, 19–36.
- Cardozo, D., Leme, D.M., Bortoleto, J.F., Catroli, G.F., Baldo, D., Faivovich, J., Kolenc, F., Silva, A.P.Z., Borteiro, C., Haddad, C.F.B. & Kasahara, S. (2011) Karyotypic Data on 28 Species of *Scinax* (Amphibia, Anura, Hylidae): Diversity and Informative Variation. *Copeia*, 2011(2), 251–263.
- Guerra, C., Baldo, D., Rosset, S., Borteiro, C. & Kolenc, F. (2011) Advertisement and release calls in Neotropical toads of the *Rhinella granulosa* group and evidence of natural hybridization between *R. bergi* and *R. major* (Anura: Bufonidae). *Zootaxa*, 3092, 26–42.
- Kolenc, F., Baldo, D., Borteiro, C., Marangoni, F., Ferraro, D.P. & Faivovich, J. (2011) The identity of *Eupemphix fuscomaculatus* Steindachner, 1864 (Amphibia: Anura). *Copeia*, 2011(4), 513–522.
- Prigioni, C., Borteiro, C. & Kolenc, F. (2011) Herpetofauna of Quebrada de los Cuervos, Uruguay. *Check List*, 76, 763–767.
- Vera Candiotti, M.F., Haad, B., Baldo, D., Kolenc, F., Borteiro, C. & Altig, R. (2011) Different pathways are involved in the early development of the transient oral apparatus in anuran tadpoles (Anura: Leiuperidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 104, 330–345.
- Borteiro, C., Kolenc, F., Pereyra, M., Rosset, S. & Baldo, D. (2010) A diploid surrounded by polyploids: tadpole description, natural history and cytogenetics of *Odontophrynus maisuma* Rosset from Uruguay (Anura: Cycloramphidae). *Zootaxa*, 2611, 1–15.
- Canavero, A., Carreira, S., Langone, J.A., Achaval, F., Borteiro, C., Camargo, A., Da Rosa, I., Estrades, A., Fallabrino, A., Kolenc, F., López-Mendilaharsu, M.M., Maneyro, R., Meneghel, M., Núñez, D., Prigioni, C. & Ziegler, L. (2010) Conservation status assessment of the amphibians and reptiles of Uruguay. *Iheringia (Zoologia)*, 100(1), 5–12.

## *Ichthyophonus* sp. (Ichthyophonae, Ichthyophonida) Infection in a South American Amphibian, the Hylid frog *Hypsiboas pulchellus*

Claudio Borteiro,<sup>1,5</sup> José Manuel Verdes,<sup>2</sup> Juan Carlos Cruz,<sup>2</sup> María Jesús Sabalsagaray,<sup>2</sup> Francisco Kolenc,<sup>1</sup> Claudio Martínez Debat,<sup>3</sup> and Martín Ubilla<sup>4</sup> <sup>1</sup>Sección Herpetología, Museo Nacional de Historia Natural, 25 de Mayo 582, Montevideo 1100, Uruguay; <sup>2</sup>Departamento de Patología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Las Plazas 1550, Montevideo 11600, Uruguay; <sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá s/n, Montevideo 11400, Uruguay; <sup>4</sup>Departamento de Evolución de Cuencas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá s/n, Montevideo 11400, Uruguay; <sup>5</sup>Corresponding author (email: borteiro@gmail.com)

**ABSTRACT:** We report infection by *Ichthyophonus* sp. in a South American amphibian, the hylid frog *Hypsiboas pulchellus* in Uruguay. This frog had a large subcutaneous mass over the urostyle and dorsal musculature comprised of parasitic cysts with mild granulomatous inflammation but otherwise appeared healthy.

Protistans of the Mesomycetozoa include emerging parasites that have been associated with high mortality in aquatic vertebrates (Rowley et al. 2013). These fungal-like organisms have received attention, as they can be spread by the introduction of alien species, posing a threat to biodiversity (Glockling et al. 2013). Several mesomycetozoans are pathogenic for amphibians, mainly *Amphibiocystidium*, *Amphibiothecum* (Dermocystida), and *Ichthyophonus* (Ichthyophonida). The genus *Ichthyophonus* includes species virulent for both fish and amphibians whose life cycles and ecology are poorly known (Mendoza et al. 2002; Rowley et al. 2013). In amphibians, it causes a chronic and potentially lethal granulomatous disease that affects skin and muscles (Raffel et al. 2006). Histopathologic diagnostic features of ichthyophonosis are the occurrence of spores with a double wall and the coexistence of resting and active spores (Mikaelian et al. 2000). Ichthyophonosis was associated with outbreaks of morbidity and mortality in frog and newt species native to the US and Canada (Herman 1984; Hill and Parnell 1996; Mikaelian et al. 2000; Green et al. 2002; Raffel et al. 2006; Ware et al. 2008; Sherman et al. 2009). We report infection by *Ichthyophonus*-like parasites in an amphibian

outside North America. We detected the condition in a juvenile specimen of the hylid frog *Hypsiboas pulchellus*. The froglet measured 20.3 mm (snout-vent length) and was collected in southern Uruguay at Paso Mauricio, Departamento de San José (34°40'58"S, 56°41'19"W; Fig. 1) on 2 November 2007 (Fig. 1). The habitat at the collection site is a temporary

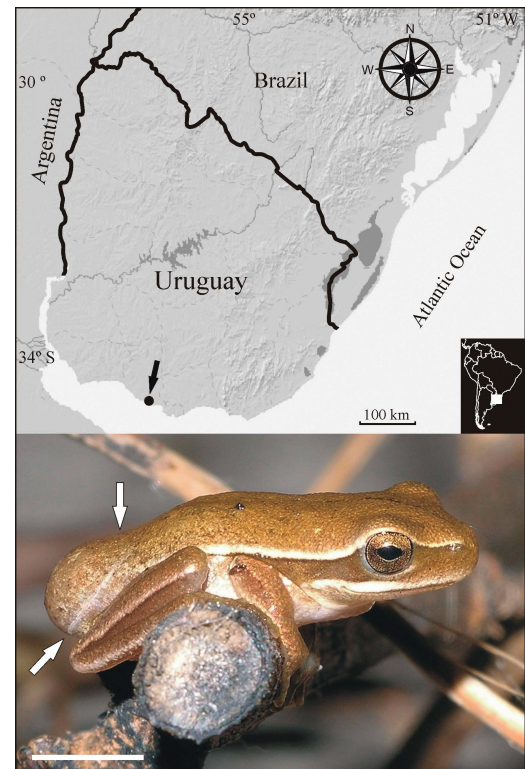


FIGURE 1. Top: study site, Paso Mauricio in southern Uruguay (arrow). Bottom: specimen of *Hypsiboas pulchellus* infected with *Ichthyophonus* sp. Arrows indicate the anterior and posterior boundaries of the lump on the back (bar=5 mm).

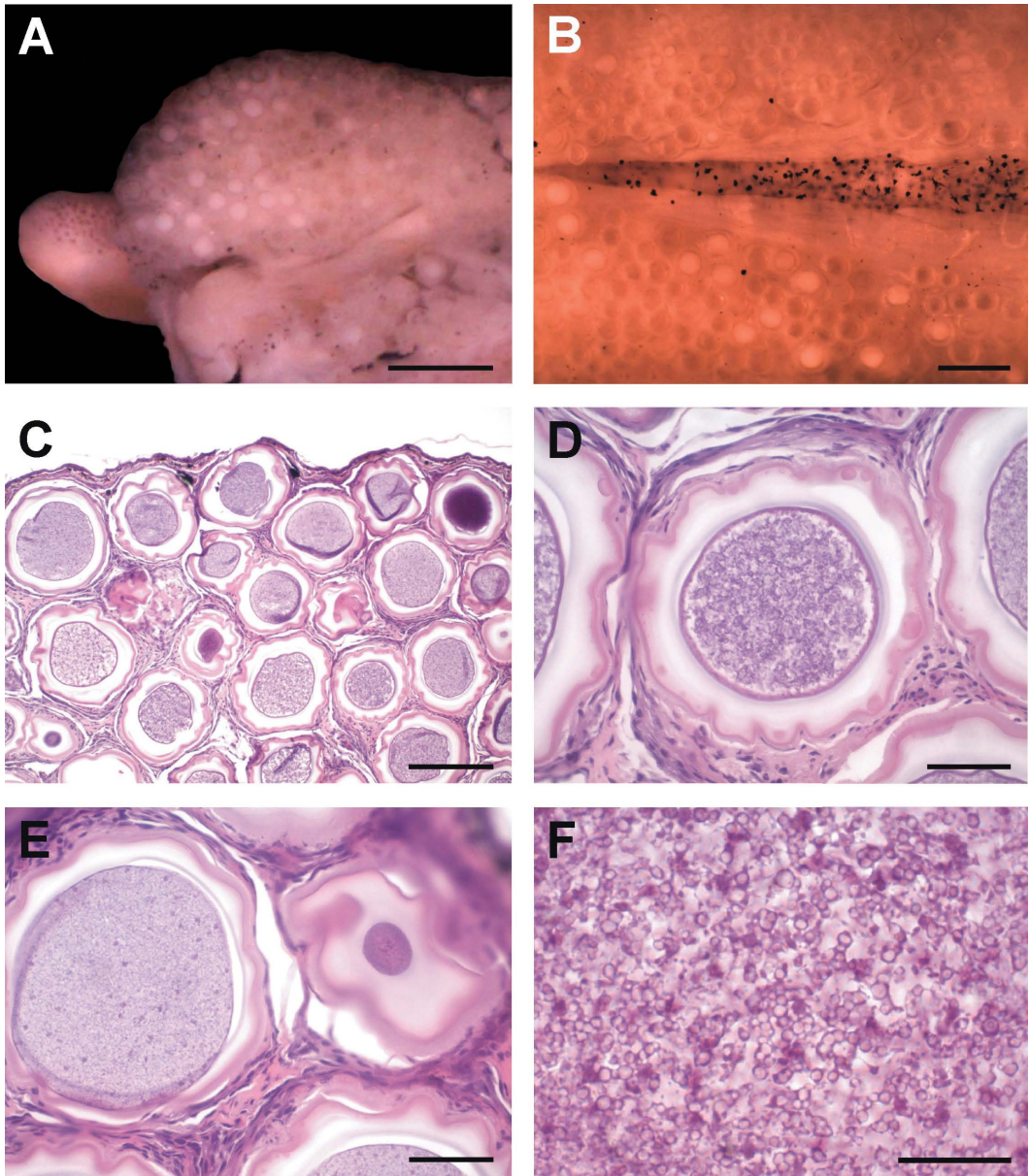


FIGURE 2. *Ichthyophonus* sp. infection in the frog *Hypsiboas pulchellus*. (A) Sagittal view of the granulomatous lump in the fixed specimen, full of parasitic cysts (bar=1 mm). (B) Surface of the dorsal muscles affected by the granuloma (bar=500  $\mu$ m). (C)–(F) Histologic sections of the lump with H&E staining: (C) low magnification view of the granuloma (bar=200  $\mu$ m); (D) active cyst at syncytial stage (bar=50  $\mu$ m); (E) active cyst at fibrous stage (left) next to a resting cyst (bar=50  $\mu$ m); (F) endospores of a mature cyst (bar=20  $\mu$ m).

pond of about 1-m maximum depth, located in a flooding area close to the stream Arroyo Mauricio. The “madrecita” livebearer fish (*Cnesterodon decemmacu-*

*latus*; Poeciliidae) was fairly abundant in the pond.

The frog was euthanized in the laboratory by cutaneous application of 20%

benzocaine (Chen and Combs 1999), fixed in 10% formalin, and deposited at the herpetologic collection of Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo (MNHN 9505). It had a lump (approximately 5×3 mm) on the urostyle covered by intact skin, with no other anomalies evident (Fig. 1). Dissection of the swelling revealed a mass of small spherical cysts of approximately 100–200 µm in the subcutaneous tissue, reaching muscular layers of the dorsum (Fig. 2); a few cysts were immediately beneath muscles, inside the coelomic cavity. The granuloma extended in the dorsal muscles (Fig. 2) for about two thirds of the dorsum, and there were only sparse cysts in its most anterior part. Internal organs were not affected. The cysts had a double wall consisting of an external eosinophilic capsule and a slightly basophilic membrane. As previously described (Goodchild 1953), smaller cysts were in resting condition, while active cysts were at different developmental stages, fibrous, syncytial, and full of endospores (Fig. 2). The capsule appeared wrinkled in smaller cysts and smoothed with increasing size. Endospores of mature cysts were about 1 µm and stained lightly basophilic with H&E. Light granulomatous inflammation was present in some areas between the cysts.

These gross and histologic findings in *H. pulchellus* are characteristic of *Ichthyophonus* infection in amphibians (Goodchild 1953; Raffel et al. 2006). In recently metamorphosed ranid frogs, infected individuals also presented with a granulomatous lump on the urostyle, and the infection often progressed to severe disease (Goodchild 1953). In our case, the frog was not severely affected and had no other signs of disease, such as abnormal postures or behavior.

Mesomycetozoean parasites from the genus *Amphibiocystidium* were reported in Neotropical amphibians from southeastern Brazil in 1940 and recently in Uruguay (Borteiro et al. 2014), but there have been no prior reports of *Ichthyophonus* in South America. The impact of these

pathogens on individuals and populations of native amphibians is unknown.

The identity of *Ichthyophonus* found in *H. pulchellus* in Uruguay deserves future work to determine its precise taxonomy and its origin and host range. Surveys and molecular studies are needed to determine if the infection spread from fish or is specific to amphibians. *Hypsiboas pulchellus* is common and widespread in southern Uruguay, and the locality where this specimen was found is only about 9.5 km west of a rearing facility of American bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*), a species that carries *Ichthyophonus* in the US (Green et al. 2002). This frog farm near the city of Libertad was established in 1998, with *L. catesbeianus* imported from Brazil (Mazzoni et al. 2003), and continued to be active at least until 2010 (C.B. and F.K. pers. obs.). Amphibian pathogens that can be dispersed by bullfrogs, such as the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranaviruses, were reported from the frog farm near Libertad and others in southern Uruguay (Mazzoni et al. 2003; Galli et al. 2006).

We thank Thomas Raffel for useful comments and Diego Arrieta for help at Sección Herpetología, Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo. The suggestions of an anonymous referee, James N. Mills, and Lee Berger greatly improved our manuscript. We also acknowledge the support of Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas and Agencia Nacional de Investigación e Innovación.

#### LITERATURE CITED

- Borteiro C, Cruz JC, Kolenc F, Verdes JM, Moraña A, Martínez Debat C, Kun A, Ubilla M, Okada K. 2014. Dermocystid-chytrid coinfection in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae). *J Wildl Dis* 50:150–153.
- Chen MH, Combs CA. 1999. An alternative anesthesia for amphibians: Ventral application of benzocaine. *Herpetol Rev* 30:34.
- Galli L, Pereira A, Márquez A, Mazzoni R. 2006. Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. *Aquaculture* 257:78–82.
- Glockling SL, Marshall WL, Gleason FH. 2013.



- Phylogenetic interpretations and ecological potentials of the Mesomycetozoea (Ichthyosporea). *Fungal Ecol* 6:237–247.
- Goodchild CG. 1953. A subcutaneous, cyst-parasite of bullfrogs: *Histocystidium ranae*, n. g., n. sp. *J Parasitol* 39:395–405.
- Green DE, Converse KA, Schrader AK. 2002. Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the U.S.A., 1996–2001. *Ann N Y Acad Sci* 969:323–339.
- Herman RL. 1984. *Ichthyophonus*-like infection in newts (*Notophthalmus viridescens* Rafinesque). *J Wildl Dis* 20:55–56.
- Hill JE, Parnell PG. 1996. Adiaspiromycosis in bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *J Vet Diagn Invest* 8:496–497.
- Mazzoni R, Cunningham AA, Daszak P, Apolo A, Perdomo E, Speranza G. 2003. Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. *Emerg Infect Dis* 9:995–998.
- Mendoza L, Taylor JW, Ajello L. 2002. The class Mesomycetozoea: a heterogeneous group of microorganisms at the animal-fungal boundary. *Annu Rev Microbiol* 56:315–344.
- Mikaelian I, Ouellet M, Pauli B, Rodrigue J, Harshbarger JC, Green DM. 2000. *Ichthyophonus*-like infection in wild amphibians from Québec, Canada. *Dis Aquat Organ* 40:195–201.
- Raffel TR, Dillard JR, Hudson PJ. 2006. Field evidence of leech-borne transmission of amphibian *Ichthyophonus* sp. *J Parasitol* 92:1256–1264.
- Rowley JJJ, Gleason FH, Andreou D, Marshall WL, Lilje O, Gozlan R. 2013. Impacts of mesomycetozoean parasites on amphibian and freshwater fish populations. *Fungal Biol Rev* 27:100–111.
- Sherman E, Tock K, Clarke C. 2009. Fluctuating asymmetry in *Ichthyophonus*-sp. infected newts, *Notophthalmus viridescens*, from Vermont. *Appl Herpetol* 6:369–378.
- Ware JL, Viverette C, Kleopfer JD, Pletcher L, Massey D, Wright A. 2008. Infection of spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*) with *Ichthyophonus*-like organisms in Virginia. *J Wildl Dis* 44:174–176.

Submitted for publication 10 June 2014.

Accepted 9 October 2014.

## Spargana in the Neotropical frog *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) from Uruguay

Claudio BORTEIRO<sup>1,5</sup>, Oscar CASTRO<sup>2</sup>, María Jesús SABALSAGARAY<sup>3</sup>,  
Francisco KOLENC<sup>1</sup>, Claudio MARTÍNEZ DEBAT<sup>4</sup> and Martín UBILLA<sup>5</sup>

1. Sección Herpetología, Museo Nacional de Historia Natural, 25 de mayo 582, Montevideo, Uruguay.

2. Departamento de Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay.

3. Departamento de Patología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay.

4. Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Iguá s/n, Montevideo, Uruguay.

5. Departamento de Evolución de Cuencas, Facultad de Ciencias, Iguá s/n, Montevideo, Uruguay.

\* Corresponding autor, C. Borteiro, E-mail: [borteiro@gmail.com](mailto:borteiro@gmail.com)

Received: 16. June 2014 / Accepted: 20. July 2014 / Available online: 02. January 2015 / Printed: June 2015

**Abstract.** We report the first record of parasitic larval tapeworms of the genus *Spirometra* (sparganum) in the frog *Hypsiboas pulchellus*. A total of 139 frogs were collected in Uruguay, and two of them presented a single sparganum (1.4%). One sparganum was found free into the coelomic cavity, and the other was located under the skin and in the coelomic cavity. The relevance of this finding in Uruguayan amphibians is discussed along with a review of available data.

**Key words:** amphibians, parasitic disease, *Spirometra*, sparganum, zoonoses.

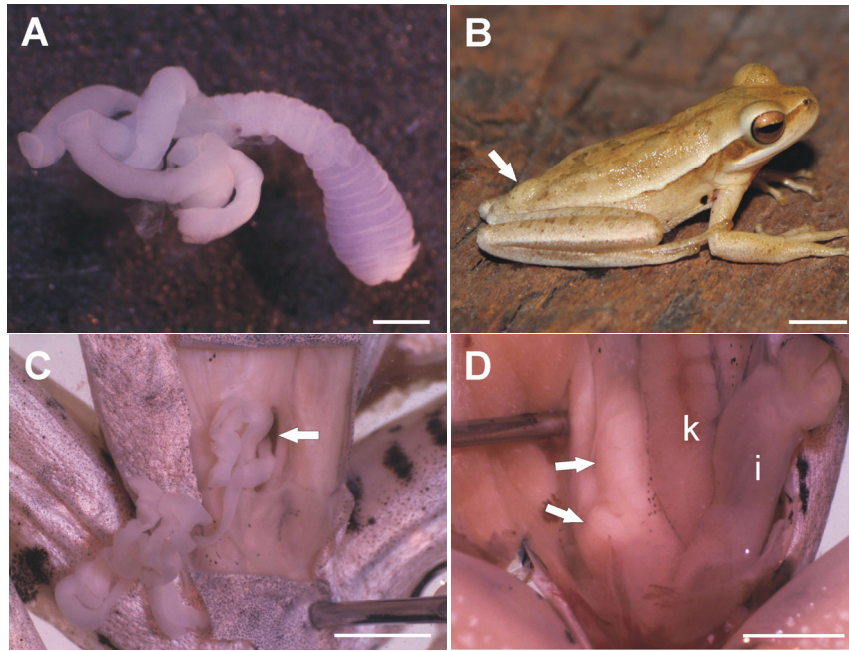
Sparganosis is a cosmopolitan parasitic disease caused by plerocercoid larvae of tapeworms belonging to the genus *Spirometra*, currently included in the family Diphyllbothriidae (Platyhelminthes: Eucestoda; see Kuchta et al. 2008). These larvae are called sparganum. Adult tapeworms inhabit the intestine of carnivore mammals (like cats and dogs), their eggs are spread with faeces and produce ciliated forms called coracidia, which once ingested by copepods (primary intermediate host) develop into proceroid larvae. The proceroid may develop the plerocercoid larval form in skin or viscera after ingestion by secondary intermediate vertebrate hosts, usually amphibians and reptiles (Mueller 1974, Bowman et al. 2002). Sparganosis is an uncommon zoonosis that could be lethal, acquired by consumption of water with infected copepods, raw amphibian and reptile meat or close contact with them, being particularly important in Asia (Chi et al. 1980, Ausayakhun et al. 1993, Hou et al. 2012).

In Uruguay, the occurrence of plerocercoid larvae of *Spirometra* was first reported by Vogelsang (1925) in anuran amphibians of the species *Leptodactylus latrans* that bore spargana encysted in forelimb musculature. Also in Uruguay, Wolffhügel and Vogelsang (1926) found sparganum in native marsupial mammals (*Didelphis albiventris* and *Lutreolina crassicaudata parnalis*). These larvae were identified as *Sparganum reptans*, and then dogs were experimentally infected using them for completion of the parasitic life cycle, identifying

the adult form as *Dibothriocephalus decipiens*, currently in the genus *Spirometra*. Dei-Cas et al. (1976) communicated also the finding of sparganum in some species of reptiles from Uruguay and in specimens of *L. latrans* collected in south of the country, at the Departments of Montevideo, Maldonado and Rocha. Spontaneous cases of *Spirometra* in domestic cats were more recently reported from Montevideo by Sampaio et al. (1987). In this work we communicate the finding of sparganum in anuran amphibians of the species *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) collected in Uruguay.

Between September 2012 and April 2014 a total of 139 specimens of *Hypsiboas pulchellus* were collected at La Paloma, Department of Rocha, in southeastern Uruguay, as part of a monitoring protocol of amphibian diseases. The specimens were captured at temporary and permanent ponds close to the Atlantic Ocean used for reproduction; they were apparently in good condition and did not present weakness, abnormal postures or behaviours. They were transported to the laboratory, euthanized by cutaneous application of lidocaine (20%) and dissected for inspection of the coelomic cavity. They were fixed in formalin 10%, preserved in ethanol 70% and deposited in the herpetological collection of Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo (MNHN). Histological preparations of worms were done to confirm diagnosis; samples from the studied specimens were embedded in parafin, sectioned at 5 µm and stained with haematoxylin and eosin.

Two male frogs (1.4%) were parasitized by a single worm each, with typical external characters of sparganum, a flattened, whitish and flexible body



**Figure 1.** Sparganosis in the frog *Hypsiboas pulchellus* from Uruguay. **A**, sparganum extracted from the coelomic cavity of an adult male frog MNHN 9503, La Paloma, Rocha (August 2013). Bar = 1 mm. **B**, adult male frog MNHN 9504 from the same site (April 2013). Notice the dorsal swelling (arrow). **C**, specimen MNHN 9504 with the swelling dissected, a large sparganum can be seen under the skin and extending to the coelomic cavity through the dorsal musculature (arrow). Bar = 2 mm. **D**, view of the parasite from the coelomic cavity (arrows), covered by a thin membrane. (i- intestine; k- kidney. Bar = 2 mm).

presenting an enlarged end with evident transverse wrinkles (Fig. 1A). The frogs, MNHN 9503 and MNHN 9504, measured 32.8 and 36.4 mm of snout-vent length, and were collected on 17 August and 17 April 2013 respectively. They were collected at a permanent pond used for cattle production in a grassland area (34°38'29" S, 54°12'39" W). In MNHN 9503, the sparganum measured 25 mm, and was found free in the coelomic cavity. In the second case a sparganum of 47 mm was found in a swelling of approximately 4 × 2 mm on the posterior part of the back (Fig. 1B). The parasite was partially located at this site under the skin, but about a half of the worm was into the coelomic cavity through a communication between the dorsal muscles. This sparganum was covered by a thin and translucent membrane (Fig. 1B-D). Examination of worm histologic preparations showed some characteristic anatomical features of cestodes such as a thick external cuticle, lack of digestive tract, groups of muscle fibers in the parenchyma and the presence of calcareous corpuscles.

In the present study, the frog *Hypsiboas pulchellus* is reported as an intermediary host of *Spi-*

*rometra* for the first time. This frog species has mostly terrestrial habits and fed mainly on terrestrial prey (Maneyro & da Rosa 2004). The acquisition of plerocercoid larvae in non-aquatic amphibians like *H. pulchellus* probably occurs during the anuran larval phase, by the accidental consumption of infested copepods (Venturini 1989). The prevalence of sparganum in the studied sample was low (1.4%) as also the parasitic load, one larva in each host. Some reports on amphibian sparganosis documented low parasitic loads (Vogelsang 1925, Gomez-Puerta et al. 2010). However, the parasitic load and incidence of sparganosis in amphibians could be high (Cui et al. 2011, Bezerra et al. 2012), causing a severe disease condition (Berger et al. 2009). It must be noticed that the observation of rather low parasitic loads is strongly influenced by sample size because high concentrations of parasites are unusual events in host populations (Poulin 2013). In our case, studied frogs seemed to be not severely affected by relatively large spargana. Most of previous reports in amphibians described small spargana, measuring between of 2 and 32 mm (Vogelsang 1925, Gomez-

Puerta et al. 2010, Bezerra et al. 2012). Berger et al. (2009) found spargana of *Spirometra erinacei* in amphibians of Australia with size up to 50 mm. The location of spargana in adult amphibians is variable, these migrant parasitic larvae can be present in the subcutaneous tissue, muscles, coelomic epithelium, liver or they are just free in the coelomic cavity (Rego & Schäffer 1992, Berger et al. 2009, Bezerra et al. 2012). As far as we know, the double location of a single larva we observed in the specimen MNHN 9504, subcutaneous and coelomic, is novel.

In Uruguay there are only two recorded cases of human sparganosis, probably caused by the ingestion of water contaminated with copepods (Osimani & Peyrallo 1954, Sakamoto et al. 2003). The risk of acquiring the disease in this country by the use of amphibians is extremely low as amphibians are not used in folk medicine and human consumption of amphibian meat is limited to *Leptodactylus latrans*, but it is extraordinary.

The species of *Spirometra* affecting amphibians in South America remains to be further characterized. The incidence and pathogenicity of its plerocercoid larvae in amphibian populations also merit more studies, as *Spirometra* has a broad host range and many species could be potentially affected (Berger et al. 2009). Coastal Uruguay is being rapidly urbanized and an increment of domestic dogs and cats that are final hosts of *Spirometra* may enhance infestations in intermediate hosts, like amphibians. This effect on wildlife was documented for other parasitic diseases as sarcoptic mange and toxoplasmosis (Dickman 1996, Skerratt et al. 1999).

**Acknowledgement.** We acknowledge R. Vilaró and A. Lasso (Biblioteca, Facultad de Veterinaria, Montevideo) for providing bibliography; CB and FK thanks PEDECIBA and ANII/SNI. We thank two anonymous reviewers for improving the manuscript.

#### References

- Ausayakhun, S., Siriprasert, V., Morakote, N., Taweessap, K. (1993): Ocular sparganosis in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 24: 603-606.
- Berger, L., Skerratt, L.F., Zhu, X.Q., Young, S., Speare, R. (2009): Severe sparganosis in Australian Tree frogs. *Journal of Wildlife Diseases* 45: 921-929.
- Bezerra, C.H., Braga, R. da R., Borges-Nojosa, D.M., Silva, G.A. (2012): Occurrence of spargana infection in *Dermatonotus muelleri* Boettger, 1885 (Anura, Microhylidae) from a coastal complex in northeastern Brazil. *Herpetology Notes* 5: 69-71.
- Bowman, D.D., Hendrix, C.M., Lindsay, D.S., Barr, S.C. (2002): *Feline clinical parasitology*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Chi, J.G., Chi, H.S., Lee, S.H. (1980): Histopathologic study on human sparganosis. *The Korean Journal of Parasitology* 18: 15-23.
- Cui, J., Lin, X.M., Zhang, H.W., Xu, B.L., Wang, Z.Q. (2011): Sparganosis, Henan Province, central China. *Emerging Infectious Diseases* 17: 146-147.
- Dei-Cas, E., Rodríguez, N., Botto, C., Osimani, J.J. (1976): Larvas plerocercoides de *Spirometra* (Dibothriocephalidae) en el hombre y animales silvestres de Uruguay. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 18: 165-172.
- Dickman, C.R. (1996): Overview of the impacts of feral cats on Australian native fauna. Australian Nature Conservation Agency, Canberra: <<http://secure.environment.gov.au/biodiversity/invasive/publications/pubs/impacts-feral-cats.pdf>>, accessed at: 2014.05.25
- Gomez-Puerta, L.A., Chávez, G., Enciso, M.A., Mendoza, A.P. (2010): Infestación por esparganos en ranas del genero *Pristimantis* (Anura, Strabomantidae) del Perú. *Revista Peruana de Biología* 17: 265-266.
- Hou, X., McManus, D.P., Lou, Z. Chen, S., Li, Y. (2012): Differentiation and diagnosis of migrating cerebral sparganosis: 2 case reports from China. *Case Reports in Clinical Medicine* 1: 13-18.
- Kuchta, R., Scholz, T., Brabec, J., Bray, R.A. (2008): Suppression of the tapeworm order Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Eucestoda) and the proposal of two new orders, Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea. *International Journal of Parasitology* 38: 49-55.
- Maneyro, R., da Rosa, I. (2004): Temporal and spatial changes in the diet of *Hyla pulchella* (Anura, Hylidae) in southern Uruguay. *Phyllomedusa* 3: 101-113.
- Mueller, J.F. (1974): The biology of *Spirometra*. *Journal of Parasitology* 61: 774-775.
- Osimani, J.J., Peyrallo, R. (1954): Segundo caso de esparganosis encontrado en América del Sur. Primer caso descrito en el Uruguay. *Archivos Uruguayos de Medicina y Cirugía Especializada* 44: 139-147.
- Poulin, R. (2013): Explaining variability in parasite aggregation levels among host samples. *Parasitology* 140: 541-546.
- Rego, A.A., Schäffer, G.V. (1992): *Sparganum* in some Brazilian vertebrates. Problems in the identification of species of *Luheella* (*Spirometra*). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 87(Suppl. 1): 213-216.
- Sakamoto, T., Gutiérrez, C., Rodríguez, A., Sauto, S. (2003): Testicular sparganosis in a child from Uruguay. *Acta Tropica* 88: 83-86.
- Sampaio, I., Castro, E., Zunini, C. (1987): Primer hallazgo de *Spirometra* sp. en *Felis catus domesticus* en Uruguay. *Revista de la Sociedad Uruguaya de Parasitología* 1: 15-20.
- Skerratt, L.F., Middleton, D., Beveridge, I. (1999): Distribution of life cycle stages of *Sarcoptes scabiei* var. *wombati* and effects of severe mange on Common Wombats in Victoria. *Journal of Wildlife Diseases* 35: 633-646.
- Venturini, L. (1989): El ciclo evolutivo experimental de *Diphyllotritium erinacei* en *Paracyclops fimbriatus*, larvas de *Bufo arenarum* y caninos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 31: 308-312.
- Vogelsang, E.G. (1925): La presencia de *sparganum* en las ranas (*Leptodactylus ocellatus*) del Uruguay. *Revista de Medicina Veterinaria (Montevideo)* 2: 301.
- Wolffhügel, K., Vogelsang, E. (1926): *Dibothriocephalus decipiens* (Diesing) y su larva *Sparganum reptans* en el Uruguay. *Revista de Medicina Veterinaria (Montevideo)* 2: 433-434.

Vol. 50, No. 1, pp. 1-158



# JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES

VOLUME 50 NUMBER 1 JANUARY 2014

JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES



JANUARY 2014

## Dermocystid-Chytrid Coinfection in the Neotropical Frog *Hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae)

Claudio Borteiro,<sup>1,7</sup> Juan Carlos Cruz,<sup>2</sup> Francisco Kolenc,<sup>1</sup> José Manuel Verdes,<sup>2</sup> Antonio Moraña,<sup>2</sup> Claudio Martínez Debat,<sup>3</sup> Alejandra Kun,<sup>4</sup> Martín Ubilla,<sup>5</sup> and Kosuke Okada<sup>6</sup> <sup>1</sup>Sección Herpetología, Museo Nacional de Historia Natural, 25 de Mayo 582, Montevideo, Uruguay; <sup>2</sup>Departamento de Patología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay; <sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Iguá s/n, Montevideo, Uruguay; <sup>4</sup>Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Av. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay; <sup>5</sup>Departamento de Evolución de Cuencas, Facultad de Ciencias, UdelaR, Iguá s/n, Montevideo, Uruguay; <sup>6</sup>Senior Volunteer of Japan International Cooperation Agency (JICA), c/o JICA Uruguay Office, Br. Artigas 417, Of. 601, CP 11300, Montevideo, Uruguay; <sup>7</sup>Corresponding author (email: borteiro@gmail.com)

**ABSTRACT:** We present gross and histologic evidence of coinfection in amphibians by fungal-like parasites of the order Dermocystidia (*Amphibiocystidium* sp.) and the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. The condition was observed in frogs *Hypsiboas pulchellus* (Hylidae) from Uruguay in 2009 to 2012. This report is the first of dermocystids in Neotropical amphibians since 1940.

Amphibian fungal-like pathogens of the order Dermocystidia have been known since the early 20th century (Pérez 1907). These parasites, grouped in the genus *Amphibiocystidium*, are present in Europe and North and South America and cause a disease that is recognized by the presence of characteristic skin nodules (González-Hernández et al. 2010). Their life cycle and the mechanisms of infection are virtually unknown (González-Hernández et al. 2010). In contrast, much research has focused on the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Chytridiomycota), which is associated with amphibian mortality and declines worldwide (Vredenburg et al. 2010). This fungus may cause skin erosions and hyperkeratosis (Voyles et al. 2009).

We present evidence of natural coinfection of both pathogens in frogs from Uruguay. While doing fieldwork in southern and eastern Uruguay to inventory amphibians, we observed three adult males of *Hypsiboas pulchellus* presenting a nodular skin disease. They were collected and transported individually to the laboratory, euthanized by cutaneous application of lidocaine 20%, fixed in

formalin, and deposited at the herpetologic collection of Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo (MNHN). Voucher specimens and collection data are the following: MNHN 9477, Valentines (33°15'S, 55°06'W) September 2009; MNHN 9478, La Paloma (34°38'S, 54°12'W) August 2011; MNHN 9479, Río Tacuarí (32°35'S, 54°04'W) August 2012 (Fig. 1). Skin samples were embedded in paraffin, sectioned at 5 µm, and stained with hematoxylin and eosin. Some nodules were fixed in 3% glutaraldehyde, embedded in epoxy resin, and ultrathin sections stained with lead citrate and uranyl acetate for electron microscope examination.

*Hypsiboas pulchellus* is a common species at the study sites, and we did not observe dead or moribund frogs. By the time studied specimens were collected, we could only capture a few additional individuals. The numbers of specimens with skin nodules/specimens captured at each site were 1/2, 1/1, and 1/15 for Valentines, La Paloma, and Río Tacuarí, respectively. Studied specimens (Fig. 2A) were collected while calling at breeding sites in temporary ponds and did not present abnormal postures or behavior; they were apparently in good condition according to their general aspect and muscle mass. Spherical nodules, some covered by ulcerated skin, were present mostly on the head and dorsum (MNHN 9477, 9479) or the belly (MNHN 9478). One specimen presented clusters of nodules in the skin over the urostyle (MNHN 9477). Nodules contained spherical cysts

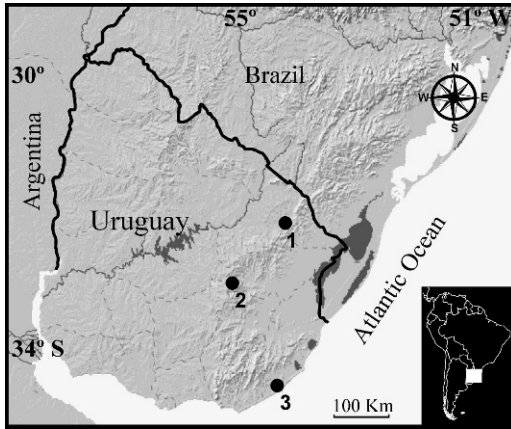


FIGURE 1. Localities of studied specimens of the frog *Hypsiboas pulchellus* in Uruguay: 1=Río Tacuarí; 2=Valentines; 3=La Paloma.

of approximately 520–540  $\mu\text{m}$  (Fig. 2B) full of eosinophilic fungal-like microorganisms of 5–9  $\mu\text{m}$  (Fig. 2C, D), and limited by a capsule (Fig. 2E). Vegetative reproductive structures were observed (Fig. 2C). The spores usually presented a large inclusion that pushed the cytoplasm and nucleus to the periphery (Fig. 2D). There were no evident inflammatory reactions in the surrounding tissue. Active *B. dendrobatidis* infection was observed in the three frog specimens, as determined by the presence of mature sporangia in histologic preparations (Fig. 2E).

The nodular disease observed is similar to previous reports of amphibian dermocyctid skin infection (Pascolini et al. 2003; González-Hernández et al. 2010). Until new evidence is obtained, we tentatively refer to the parasites found in *H. pulchellus* as *Amphibiocystidium* sp. The only previous report of dermocyctids in Neotropical amphibians is the description of *Amphibiocystidium hylarum* in frogs from southeastern Brazil (Carini 1940). Our specimens were collected approximately 1,500 km further south, suggesting a wide distribution of dermocyctid infection in Neotropical amphibians. Infection by *B. dendrobatidis* in native amphibians is known from a few localities in northern and coastal southern Uruguay (Borteiro

et al. 2009). Our findings of this pathogen at Valentines and Río Tacuarí are the first for central and northeastern Uruguay, respectively.

Coinfection of *B. dendrobatidis* with other eukaryotic skin pathogens has not been previously documented in free-living amphibians. Green and Kagarise Sherman (2001) identified *B. dendrobatidis* and *Amphibiocystidium penneri* in toads (*Anaxyrus canorus*) inhabiting the same site but did not observe a true coinfection. Groner and Relyea (2010) reported dermal cysts presumably due to *Amphibiocystidium viridescens* in populations of newts *Notophthalmus viridescens* infected by *B. dendrobatidis* but without further detail.

We are unaware on how dermocyctid parasites and the coinfection with *B. dendrobatidis* can affect native amphibians in Uruguay. Further research is needed to study the possible interaction between the pathogens in amphibian skin and whether skin damage by *B. dendrobatidis* would facilitate dermocyctid infection or vice versa.

We thank M.J. Sabalsagaray and J.C. Rosillo for assistance at the laboratory; T. Raffel and R. Tadeu kindly shared literature. We acknowledge financial support from Agencia Nacional de Investigación e Innovación and Japan International Cooperation Agency.

#### LITERATURE CITED

- Borteiro C, Cruz JC, Kolenc F, Aramburu A. 2009. Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. *Dis Aquat Organ* 84:159–162.
- Carini A. 1940. Sobre um parasito semelhante ao “*Rhinosporidium*” encontrado em quistos da pele de uma “*Hyla*.” *Arq Inst Biol* (São Paulo) 11:93–96.
- González-Hernández M, Denoël M, Duffus AJL, Garner TWJ, Cunningham AA, Acevedo-Whitehouse K. 2010. Dermocyctid infection and associated skin lesions in free-living palmate newts (*Lissotriton helveticus*) from southern France. *Parasitol Int* 59:344–350.
- Green DE, Kagarise Sherman C. 2001. Diagnostic histological findings in Yosemite toads (*Bufo canorus*) from a die-off in the 1970s. *J Herpetol* 35:92–103.
- Groner ML, Relyea RA. 2010. *Batrachochytrium dendrobatidis* is present in northwest Pennsylvania,

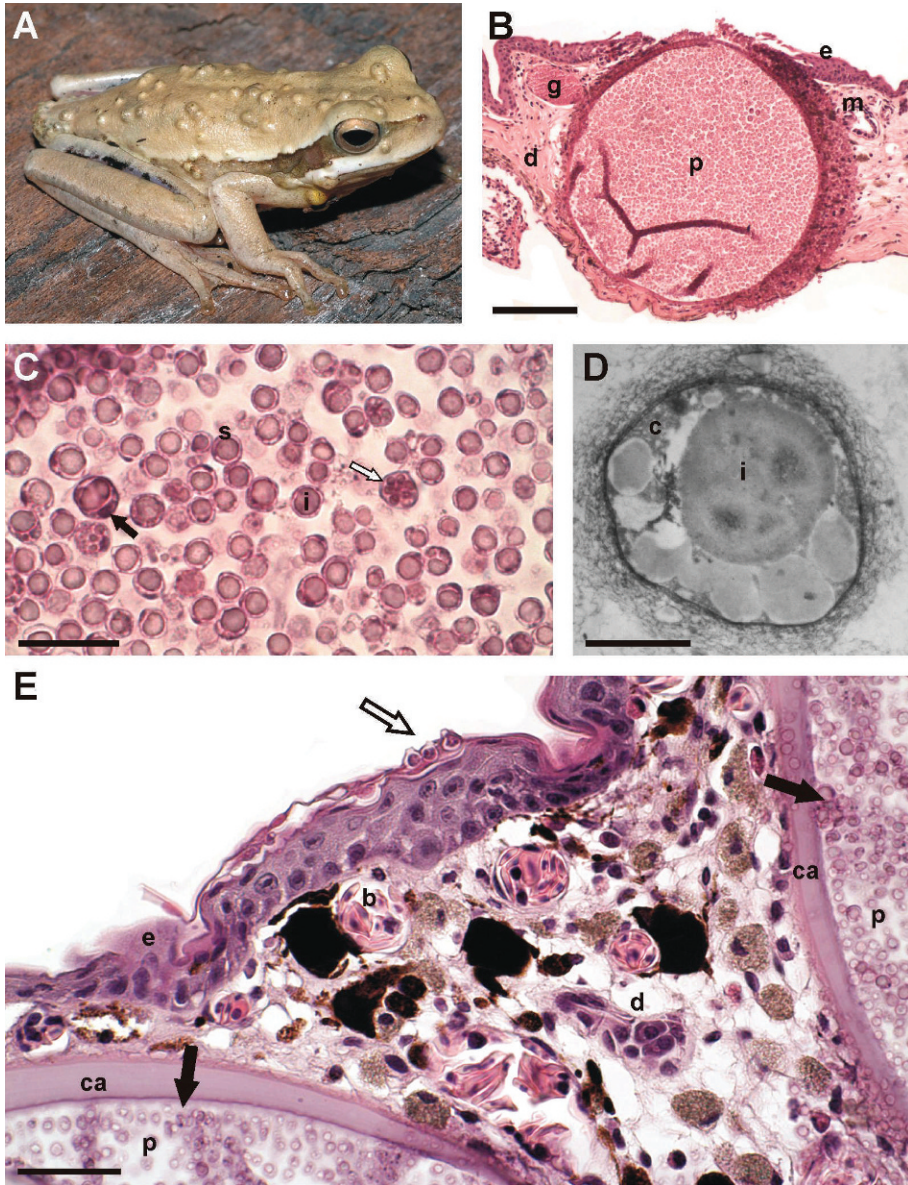


FIGURE 2. *Amphibiocystidium* sp. infection in the frog, *Hypsiboas pulchellus* in Uruguay. (A) Skin nodules in an adult specimen (MNHN 9477, snout-vent length 34.3 mm). (B) Histologic section of a nodule: d=dermis; e=epidermis; g=granular gland; m=mucous gland; p=parasitic cyst (bar=200  $\mu$ m). (C) Cyst content at higher magnification: s=spores; i=inclusion; black arrow indicates vegetative reproduction (bar=20  $\mu$ m). (D) Transmission electron microscope image of a spore: c=cytoplasm; i=inclusion (bar=2  $\mu$ m). (E) cysts of *Amphibiocystidium* sp. (black arrows) and *Batrachochytrium dendrobatidis* (white arrow): ca=cyst capsule; b=blood vessel; d=dermis; e=epidermis. Note superficial erosion (bar=50  $\mu$ m).

USA, with high prevalence in *Notophthalmus viridescens*. *Herp Rev* 41:462-465.

Pascolini R, Daszak P, Cunningham AA, Tei S, Vagnetti D, Bucci S, Fagotti A, Di Rosa I. 2003.

Parasitism by *Dermocystidium ranae* in a population of *Rana esculenta* complex in central Italy and description of *Amphibiocystidium* n. gen. *Dis Aquat Organ* 56:65-74.



- Pérez C. 1907. *Dermocystis pusula* organisme nouveau parasite de la peau des tritons. *C R Soc Biol (Paris)* 63:445–447.
- Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C, Voyles WF, Dinudom A, Cook D, Webb R, Alford RA, Skerratt LF, et al. 2009. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science* 326:582–585.
- Vredenburg VT, Knapp RA, Tunstall TS, Briggs CJ. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9689–9694.

*Submitted for publication 30 June 2013.*

*Accepted 24 September 2013.*

## Recent findings of the declining frog *Pleurodema bibroni* Tschudi, 1838 (Anura: Leiuperidae) in Uruguay

Francisco Kolenc<sup>1\*</sup>, Claudio Borteiro<sup>1</sup>, Enrique M. González<sup>1</sup>, Diego A. Barrasso<sup>2</sup>, and Carlos Prigioni<sup>1</sup>

*Pleurodema bibroni* (Fig. 1) was formerly widespread and abundant in Uruguay, being a frog commonly collected by the naturalists of the 19th century who visited the northern shore of the River Plate. For example, A. d'Orbigny, C. Darwin, and M. Jiménez de la Espada brought specimens to Europe which resulted in multiple descriptions of it (Tschudi, 1838; Bell, 1843; Jiménez de la Espada, 1875).

The species was common in much of southern Uruguay at least until the mid-1970s or early 1980s, when it seems to have suffered a sudden, severe and widespread decline (for a historical review and a defence of the case for a recent decline, see Kolenc et al., 2009). Apart from Uruguay, *P. bibroni* is known from north-eastern Rio Grande do Sul state, Brazil, where no findings were reported after 1973 (Braun, 1973), although some specimens preserved in natural history collections were collected in 1976 (Kolenc et al., 2009). Recently, some specimens collected in north-eastern Paraguay in 1893-1894 and previously confused with *Physalaemus fuscomaculatus* (Ceí, 1990) were identified as *P. bibroni* (Kolenc et al., 2011). There are no later records of this species in Paraguay (Brusquetti and Lavilla, 2006). Assessments of the conservation status of *P. bibroni* considered this species as “near threatened” globally (Silvano et al., 2004) and “vulnerable” in Uruguay (Canavero et al., 2010). The cause of the decline of many populations is unknown: habitat destruction may be associated with vanished populations in some coastal areas, but the species also disappeared from relatively

unaltered habitats (Kolenc et al., 2009). Other possible causes are climate change and chytrid infection. Although the presence of chytrids was demonstrated in sites where the species was extirpated, it was also detected in one of the few remaining populations (Borteiro et al., 2009; Bardier et al., 2011).

Intensive fieldwork recently led to the finding of some remnant populations of this species in Uruguay (Natale and Maneyro, 2008; Kolenc et al., 2009). Since the last review in 2009, some new localities inhabited by *Pleurodema bibroni* were found. In this paper we report these localities and present an updated map of the places where this species is known to occur at present. We include in this last category those records since 2000, which except for one are posterior to 2007. Voucher specimens are housed in the herpetological collection of the Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo, Uruguay (MNHN).

The new localities of *Pleurodema bibroni* are the following:

Uruguay, Departamento de Canelones, Balneario Jaureguiberry, 34.77° S; 55.41° W; altitude 5 m a.s.l.; MNHN 9455: Many males were calling at night on 20

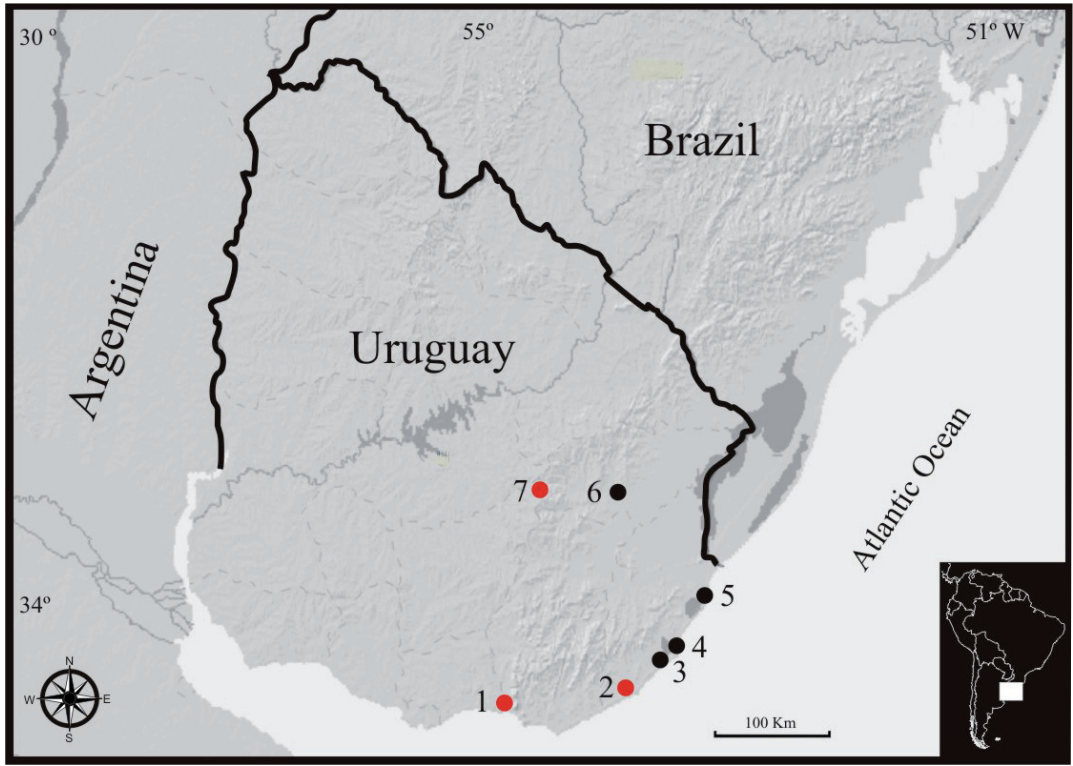


**Figure 1.** Male of *Pleurodema bibroni* from Valentines, Departamento de Treinta y Tres, Uruguay.

<sup>1</sup> Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo, 25 de Mayo 582, Montevideo, Uruguay;  
e-mail: fkolenc@gmail.com

<sup>2</sup> Laboratorio de Ecología Molecular, Centro Regional de Estudios Genómicos, Universidad Nacional de La Plata, and CONICET, Av. Calchaquí km 23.5, Piso 4, 1888 Florencio Varela, Buenos Aires, Argentina.

\* Corresponding author



**Figure 2.** Updated map with the localities where *Pleurodema bibroni* is currently known to occur in Uruguay. Black dots represent records based on Kolenc *et al.* (2009) and red dots represent the new records. 1) Jaureguiberry, Canelones; 2) Laguna de las Nutrias, Rocha; 3) km 248-255 Route 10, Rocha; 4) several localities in the surroundings of Barra de Valizas and Refugio de Fauna Laguna de Castillos, Rocha; 5) Cerro Verde, Rocha; 6) Ciudad de Treinta y Tres, Treinta y Tres (recorded call, not vouchered); and 7) Valentines, Treinta y Tres.

June 2011 from a temporary pond, close to the shore of the Solis Grande Stream. Two amplexant pairs were observed.

Uruguay, Departamento de Rocha, Laguna de las Nutrias, 34.68° S; 54.28° W; altitude 9 m a.s.l.; MNHN 9457, 9458: Two specimens were collected with pit-fall traps on 20 December 2011 as a result of faunal surveys. No additional specimens were observed.

Uruguay, Departamento de Treinta y Tres, Valentines, 33.25° S; 55.11° W; altitude 280 m a.s.l.; MNHN 9456: Some males were calling at night on 5 July 2009, on a temporary pond on a prairie on hilly landscapes. Two clutches were observed. We found tadpoles of this species on later visits to this pond, on 17 August 2009 and 5 September 2009.

The new localities presented herein significantly extend the known current presence of the species (Fig. 2), although all of them fall within its historical

geographic range. These new findings may correspond to remnant populations, since they appear isolated. Intensive searches in areas close to the ponds at Valentines and Jaureguiberry on repeated occasions resulted in no additional findings, and previous surveys in surrounding areas were negative (see comments in Kolenc *et al.*, 2009). The pond at Valentines occurs in a prairie with cattle, with no remarkable differences with the landscapes of surrounding areas. On the contrary, the pond at Jaureguiberry occurs on a relic of riparian plains, next to urbanized zones. Historical records before 1975 close to both localities are common (Núñez *et al.*, 2004; Kolenc *et al.*, 2009; Prigioni, Borteiro and Kolenc, 2011). The finding at Laguna de las Nutrias, at the southwestern shore of Laguna de Rocha is very interesting, since the eastern and south-eastern shores of this last lagoon (only eight km distant) were intensively and repeatedly searched for the last ten years with negative

results, and chytrid fungus infection is widespread in the amphibians of this place (Borteiro et al., 2009; Borteiro and Kolenc, unpublished results). The last documented finding of *Pleurodema bibroni* close to Laguna de las Nutrias dates from 1991, at La Paloma Resort, 12 km to the north-east (Kolenc et al., 2009).

The new findings of *Pleurodema bibroni* in Uruguay highlight the value of intensive surveys, as more remnant populations are likely to occur. Additional studies are needed to assess the current status of extant populations of this species and to identify the causes of its historical decline.

**Acknowledgements.** Collection permits were issued by Departamento de Fauna/MGAP. C. Borteiro and F. Kolenc received support from SNI/ANII; D. Baldo helped with the map and D. Arrieta with the collection at MNHN. We acknowledge D. Ferraro and Z. Nagy for their valuable comments and corrections to the manuscript.

## References

- Bardier, C., Ghirardi, R., Levy, M., Maneyro, R. (2011): First case of chytridiomycosis in an adult specimen of a native anuran from Uruguay. *Herpetological Review* 42: 65-66.
- Bell, T. (1843): *Zoology of the Voyage of H.M.S. Beagle, Under the Command of Captain Fitzroy, R.N., During the Years 1832 to 1836. Part V. Reptiles.* London, Smith, Elder & Co.
- Borteiro, C., Cruz, J.C., Kolenc, F., Aramburu, A. (2009): Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. *Diseases of Aquatic Organisms* 84: 159-162.
- Braun, C.A.S. (1973): Sôbre a ocorrência de *Pleurodema bibronii* Tschudi, 1828 no estado do Rio Gande do Sul, Brasil (Anura, Leptodactylidae). *Iheringia (Série Zoologia)* 44: 28-31.
- Brusquetti, F., Lavilla, E. (2006): Lista comentada de los anfibios de Paraguay. *Cuadernos de Herpetología* 20: 3-79.
- Canavero, A., Carreira, S., Langone, J.A., Achaval, F., Borteiro, C., Camargo, A., da Rosa, I., Estrades, A., Fallabrino, A., Kolenc, F., López-Mendilaharsu, M.M., Maneyro, R., Meneghel, M., Núñez, D., Prigioni, C.M., Ziegler, L. (2010): Red list of the amphibians and reptiles of Uruguay. *Iheringia (Série Zoologia)* 100: 5-12.
- Cei, J.M. (1990): On a Paraguayan sample of a long time confused species: *Physalaemus fuscomaculatus* (Steindachner, 1864) (Anura, Leptodactylidae). *Bolletino del Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino* 8: 215-231.
- Jiménez de la Espada, M. (1875): *Vertebrados del Viaje al Pacífico Verificado de 1862 a 1865 por una Comisión de Naturalistas Enviada por el Gobierno Español.* Batracios. Madrid, Imprenta Miguel Ginesta.
- Kolenc, F., Borteiro, C., Baldo, D., Ferraro, D.P., Prigioni, C. (2009): The tadpoles and advertisement calls of *Pleurodema bibroni* Tschudi and *Pleurodema kriegi* (Müller), with notes on their geographic distribution and conservation status (Amphibia, Anura, Leiuperidae). *Zootaxa* 1969: 1-35.
- Kolenc, F., Baldo, D., Borteiro, C., Marangoni, F., Ferraro, D.P., Faivovich, J. (2011): The Identity of *Eupemphix fuscomaculatus* Steindachner, 1864 (Amphibia: Anura). *Copeia* 2011: 513-522.
- Natale, G.S., Maneyro, R. (2008): Notes on Geographic Distribution. *Amphibia, Anura, Leiuperidae, Pleurodema bibroni: Rediscovery.* *Check List* 4: 47-49.
- Núñez, D., Maneyro, R., Langone, J., de Sá, R.O. (2004): Distribución geográfica de la fauna de anfibios del Uruguay. *Smithsonian Herpetological Information Service* 134: 1-36.
- Prigioni, C., Borteiro, C., Kolenc, F. (2011): Amphibia and Reptilia, Quebrada de los Cuervos, Departamento de Treinta y Tres, Uruguay. *Check List* 7: 763-767.
- Silvano, D., Lavilla, E., Garcia, P., Langone, J. (2004): *Pleurodema bibroni*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Available at: <http://www.iucnredlist.org>. Last accessed on 26 April 2012.
- Tschudi, J.J. (1838): Classification der Batrachier, mit Berücksichtigung der fossilen Thiere dieser Abtheilung der Reptilien. *Mémoires de la Société des Sciences Naturelles de Neuchâtel* 2: 1-99.



## Lista de figuras

- FIGURA I.1.** *Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae). Pág. 13
- FIGURA I.2.** *Pleurodema bibroni* (Anura, Leiuperidae) Pág. 18
- FIGURA II.1.** Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en larvas de anuros de Uruguay. Pág. 35
- FIGURA 3.1.** Distribución geográfica de los diagnósticos de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* realizados en anfibios nativos. Pág. 51
- FIGURA 3.2.** Diagnósticos de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios nativos. Pág. 52
- FIGURA 3.3.** Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Physalaemus henselii*, cercanías de Cerro Colorado, Departamento de Florida, Uruguay (5/IX/2009). Pág. 53
- FIGURA 3.4.** Quitridiomicosis en un ejemplar adulto de *Limnomedusa macroglossa* de Sierra de las Ánimas, Departamento de Maldonado, Uruguay (11/IX/2005). Pág. 54
- FIGURA 3.5.** Anfibios de la colección herpetológica CENAI-MACN procedentes de la Barra del Río Santa Lucía, Uruguay, obtenidos por el herpetólogo argentino Avelino Barrio. Pág. 58
- FIGURA 3.6.** Variación estacional en la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Hypsiboas pulchellus*, La Paloma/Laguna de Rocha, Departamento de Rocha. Pág. 60
- FIGURA 4.1.** Población silvestre de *Lithobates catesbeianus* en Aceguá, Departamento de Cerro Largo, Uruguay. Pág. 70
- FIGURA 4.2.** Distribución geográfica de los diagnósticos de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* realizados en anfibios introducidos a Uruguay. Pág. 71
- FIGURA 4.3.** Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en larvas Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*) de Uruguay. Pág. 73
- FIGURA 4.4.** Diagnóstico de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en adultos de Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*) de Uruguay. Pág. 74
- FIGURA 5.1.** Representación esquemática de las diferencias entre los tres haplotipos de *Batrachochytrium dendrobatidis* identificados en Uruguay. Pág. 84
- FIGURA 5.2.** Distribución geográfica y hospedadores de los haplotipos de *Batrachochytrium dendrobatidis* identificados en Uruguay en este estudio (I-III, ver texto). Pág. 86
- FIGURA III.1.** Representación esquemática parcial de las relaciones filogenéticas del DRIP (Ichthyosporaea), adaptado de Fredericks *et al.* (2000). Pág. 93
- FIGURA 6.1.** Infección por *Rhinosporidium seeberi* en humanos. Pág. 96
- FIGURA 6.2.** Infección por *Dermocystidium pusula*, adaptado de Pérez (1913). Pág. 97
- FIGURA 6.3.** Árboles más inclusivos en análisis filogenéticos previos del Orden Dermocystida. Pág. 99
- FIGURA 6.4.** Infección por Dermocystida en *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9477, Valentines, Departamento de Treinta y Tres, Uruguay (5/IX/2009). Pág. 109
- FIGURA 6.5.** Infección por Dermocystida en *Hypsiboas pulchellus*, La Paloma, Departamento de Rocha, Uruguay. Pág. 110
- FIGURA 6.6.** Distribución geográfica de los hallazgos de infección por Dermocystida en *Hypsiboas pulchellus* en Uruguay. Pág. 110

- FIGURA 6.7.** Infección por Dermocystida en *Scinax fuscovarius* CFBH 39120, Rio Claro, São Paulo, Brasil (3/XI/2014). Pág. 112
- FIGURA 6.8.** Infección por Dermocystida en *Scinax fuscovarius* CFBH 39121, Rio Claro, São Paulo, Brasil (3/XI/2014). Pág. 113
- FIGURA 6.9.** Localización geográfica de Dermocystida parásitos de anfibios en el sureste de Brasil, estado de São Paulo. Pág. 114
- FIGURA 6.10.** Árbol más parsimonioso de los Dermocystida (consenso estricto). Pág. 116
- FIGURA 6.11.** Relaciones filogenéticas obtenidas en Dermocystida y nuevo ordenamiento taxonómico propuesto. Pág. 120
- FIGURA 7.1.** Sitios de colecta de ejemplares de *Hypsiboas pulchellus* que presentaron infección por *Rhinosporidium rwandae* en Uruguay. Pág. 133
- FIGURA 7.2.** *Hypsiboas pulchellus*, regiones anatómicas del tronco consideradas. Pág. 134
- FIGURA 7.3.** Infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*, distribución de frecuencias de nódulos cutáneos por ejemplar (n = 22). Pág. 138
- FIGURA 7.4.** Infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*, distribución de nódulos por región anatómica y porcentaje de superficie corporal de cada una representa (n = 22). Pág. 138
- FIGURA 7.5.** Infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*, imágenes de lesiones macroscópicas. Pág. 140
- FIGURA 7.6.** Infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9477, corte histológico de un nódulo cutáneo, tinción H&E. Pág. 141
- FIGURA 7.7.** Endosporas de *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*. Pág. 142
- FIGURA 7.8.** Frotis por aplastamiento de un nódulo cutáneo causado por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9477, tinción 15. Pág. 142
- FIGURA 7.9.** Diferenciación entre glándulas cutáneas y esporangios de *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*. Pág. 143
- FIGURA 7.10.** Infección cardíaca por *Rhinosporidium rwandae*, ejemplar de *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9506. Pág. 144
- FIGURA 7.11.** *Rhinosporidium rwandae*, micrografías electrónicas de transmisión obtenidas de *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9477. Pág. 144
- FIGURA 7.12.** Esquema del diagnóstico macroscópico diferencial de infección cutánea por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus* (hallazgos en la muestra estudiada). Pág. 145
- FIGURA 7.13.** Diagnóstico diferencial macroscópico de infección cutánea por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*. Pág. 147
- FIGURA 7.14.** Variación estacional en la prevalencia de infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus* de La Paloma/Laguna de Rocha, Departamento de Rocha. Pág. 149
- FIGURA 7.15.** Coinfección *Rhinosporidium* - *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9477, corte histológico de piel dorsal, tinción H&E. Pág. 151
- FIGURA 7.16.** Coinfección *Rhinosporidium* - *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Hypsiboas pulchellus* MNHN 9478, corte histológico de piel ventral, tinción H&E. Pág. 152
- FIGURA 8.1.** Infección por *Ichthyophonus* en el tritón *Notophthalmus viridescens*. Pág. 164

<b>FIGURA 8.2.</b> Infección por <i>Ichthyophonus</i> sp. en <i>Hypsiboas pulchellus</i> , ubicación geográfica del sitio de estudio, Paso Mauricio, Departamento de San José.	Pág. 166
<b>FIGURA 8.3.</b> Hábitat del sitio de estudio en Paso Mauricio, cuerpos de agua próximos al cauce del Arroyo Mauricio (18/V/2014).	Pág. 167
<b>FIGURA 8.4.</b> Infección por <i>Ichthyophonus</i> sp. en un ejemplar juvenil de <i>Hypsiboas pulchellus</i> MNHN 9505, lesiones macroscópicas.	Pág. 169
<b>FIGURA 8.5.</b> Infección por <i>Ichthyophonus</i> sp. en <i>Hypsiboas pulchellus</i> MNHN 9505, cortes histológicos, tinción H&E.	Pág. 170
<b>FIGURA 8.6.</b> Ubicación de un criadero de Rana toro norteamericana cercano al sitio de estudio Paso Mauricio, próximo a Libertad, Departamento de San José (imagen de fondo captada de Google Earth, 18/V/2014).	Pág. 172
<b>FIGURA 9.1.</b> Infestación por esparganos en <i>Hypsiboas pulchellus</i> .	Pág. 181
<b>FIGURA 9.2.</b> Corte histológico de espargano extraído de <i>Hypsiboas pulchellus</i> MNHN 9504, tinción H&E.	Pág. 182
<b>FIGURA 10.1.</b> Melanoforomas en <i>Hypsiboas pulchellus</i> .	Pág. 191
<b>FIGURA 10.2.</b> Lipoma subcutáneo en <i>Melanophryniscus sanmartini</i> MNHN 9510.	Pág. 192
<b>FIGURA 10.3.</b> Hiperpigmentación anómala no neoplásica en un ejemplar subadulto de Rana toro norteamericana ( <i>Lithobates catesbeianus</i> ), Aceguá, Cerro Largo, Uruguay (25/V/2012).	Pág. 194
<b>FIGURA 11.1.</b> Trombidiasis en <i>Hypsiboas pulchellus</i> y <i>Leptodactylus latrans</i> .	Pág. 201
<b>FIGURA 11.2.</b> Trombidiasis en <i>Scinax squalirostris</i> , <i>Scinax granulatus</i> e <i>Hypsiboas pulchellus</i> .	Pág. 202
<b>FIGURA 3.I.</b> Distribución geográfica de <i>Physalaemus henselii</i> en Uruguay.	Pág. 223
<b>FIGURA 3.II.</b> Especímenes de <i>Physalaemus henselii</i> de Uruguay y sur de Brasil (estado de Rio Grande do Sul) presentes en las colecciones herpetológicas estudiadas, colectados entre 1930 y 2010.	Pág. 224
<b>FIGURA 3.III.</b> Distribución geográfica de <i>Pleurodema bibroni</i> en Uruguay.	Pág. 225
<b>FIGURA 3.IV.</b> Especímenes de <i>Pleurodema bibroni</i> procedentes de Uruguay presentes en las colecciones herpetológicas estudiadas, según año de colecta.	Pág. 226
<b>FIGURA 3.V.</b> Distribución geográfica de <i>Physalaemus fernandezae</i> en Uruguay.	Pág. 227
<b>FIGURA 4.I.</b> Anfibios encontrados muertos en condiciones naturales en Uruguay.	Pág. 229





## Lista de tablas

- TABLA 3.1.** Sensibilidad de la técnica de PCR utilizando muestras con cantidades variables de ADN molde de *Bd* (cepa JEL423). Pág. 50
- TABLA 3.2.** Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios nativos. Pág. 55
- TABLA 3.3.** Diagnóstico histológico de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en ejemplares de *Physalaemus henselii* (*Ph*) y *Pleurodema bibroni* (*Plb*) positivos al PCR. Pág. 57
- TABLA 3.4.** Muestreo histológico retrospectivo de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en ejemplares de colecciones Pág. 59
- TABLA 3.5.** Prevalencia de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Hypsiboas pulchellus* en distintas épocas del año, y sus correspondientes IC 95 %. Pág. 61
- TABLA 3.6.** Comparación de las prevalencias de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en *Hypsiboas pulchellus*. Pág. 61
- TABLA 4.1.** Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* en Rana toro norteamericana (*Lithobates catesbeianus*) de Uruguay. Pág. 72
- TABLA 4.2.** Anfibios del mercado de animales de compañía y colecciones privadas en Uruguay estudiados mediante PCR para la detección de *Batrachochytrium dendrobatidis*. Pág. 75
- TABLA 5.1.** Origen de las secuencias de la región ITS de *Batrachochytrium dendrobatidis* obtenidas de anfibios de Uruguay. Pág. 85
- TABLA 6.1.** Muestreo de secuencias del gen 18S obtenidas de GenBank para el análisis filogenético de Dermocystida. Pág. 103
- TABLA 6.2.** Infección por Dermocystida en anfibios, presentación y diversidad de especies pertenecientes a los géneros *Amphibiothecum*, *Dermocystidium*, *Dermomycoides* (*De*), *Hepatosphera*, *Rhinosporidium* y *Sphaerothecum*. Pág. 121
- TABLA 7.1.** Prevalencias de infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus* en distintas épocas del año, y sus correspondientes IC 95 %. Pág. 149
- TABLA 7.2.** Comparación de las prevalencias estacionales de infección por *Rhinosporidium rwandae* en *Hypsiboas pulchellus*. Pág. 150
- TABLA 3.I.** Localidades y muestreos realizados en el rango de distribución de *Physalaemus fernandezae* (*Pf*), *P. henselii* (*Ph*) y *Pleurodema bibroni* (*Plb*) en Uruguay (2000–2014). Pág. 222