

1 May 2009

Protocolo Para Muestras de Quitridio: Método SWAB

El protocolo que a continuación se describe es utilizado en campo, cautiverio y en laboratorio.

Este protocolo fue desarrollado para permitir a los biólogos de campo, tomar muestras no invasivas a anfibios de vida silvestre, con el fin de detectar en laboratorio al hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis*. Este protocolo esta basado en la publicación de Boyle et al. (2004).

Si tiene preguntas, favor de contactar a Vance Vredenburg (vancev@sfsu.edu).

Provisiones:

SWABS: (Cotonetes):

Hay dos formas como puede ordenarlos:

1. Directamente: Medical Wire and Equipment:
Se encuentra en <http://mwe-usa.com/mwe/mwe.php>
The product code is MW113.
2. Usando distribuidor: Advantage Bundling SP. (número de catalogo MW113). El distribuidor Advantage Bundling puede ser localizado por medio de teléfono, 1-866-Bundling, o también puede usar e-mail: sales@advantagebundlingsp.com.

Nota: Preferiblemente utilice estos SWABS (cotonetes) ya que son necesarios para realizar el protocolo de laboratorio.

FRASCOS O TUBOS:

Tubos de 1.5 ml para microcentrifuga, los cuales deben de tener tapa de tuerca. Estos tubos son estándares y se pueden ordenar a través de muchas companies. Un ejemplo es Fisher Scientific (número de catalogo 05-669-12). Antes de usar los tubos deben de ser esterilizados en autoclave o pueden ser adquiridos ya pre-esterilizados, pero a un costo mayor (Fisher número de catalogo 05-669-17).

MARCAJE DE TUBOS:

Cuando sea posible, use marcadores a prueba de etanol, para etiquetar sus viales, de esta manera permanecerán identificados por más tiempo. Algunas personas prefieren rayar identificación en el vial, ya que no puede ser lavada o borrada por accidente.

Procedimiento:

1. Preferiblemente, capture los anfibios a mano. Es muy importante que use guantes, si le es muy difícil conseguirlos, usted también puede usar bolsas de plástico. Debe de cambiarse los guantes entre toma y toma de muestra. Si usted utiliza una red para la captura de anfibios, esté consiente de que las zoosporos de *B. dendrobatidis* podrían adherirse a la red y éstas posiblemente se transferirían a los individuos, por lo tanto

utilice siempre que le sea posible diversas redes, o desinfecte la red tanto como usted pueda, de preferencia entre cada captura (por favor que sean tan a menudo como usted pueda, ya que no es la solución perfecta a este problema).

2. En adultos y metamórficos el SWAB (cotonete) debe de ser deslizado en total 30 veces en las siguientes partes del anfibio: la superficie inferior o vientre, ingles, piernas, membranas interdigitales (membranas entre cada uno de dedos de los miembros inferiores). Recuerde que de hecho usted está raspando cantidades muy pequeñas de tejido muy fino de la piel del anfibio, pero debe de ser cuidadoso de no lastimar al animal. Se debe de aplicar una cierta presión sobre el animal, pero esto no significa que usted deba de aplastar al anfibio. Las áreas donde nos debemos de enfocar al realizar el raspado, son aquellas que tengan mayor cantidad de queratina, como lo son: la ingle, muslos y membranas interdigitales. Para los renacuajos, se desliza el SWAB (cotonete) en la única área queratinizada del anfibio en este estadio de desarrollo: la boca.
3. Seque el SWAB (cotonete) al aire por aproximadamente 5 minutos, si es posible evite el contacto directo de la luz del sol sobre el SWAB (si las condiciones son demasiado húmedas, entonces puede colocar el SWAB en etanol EtOH al 95%).
4. Rompa el palillo de soporte del SWAB (cotonete) aproximadamente a unos 3cm de la punta y colóquelo una vez seco en el tubo vacío (o en su defecto con etanol al 95 %). Debe de tener cuidado de que el palillo del SWAB (cotonete) no toque la tapa del tubo o vial. Atornille la tapa en el vial y almacene en un lugar sombreado..
5. Las muestras pueden ser guardadas a una temperatura ambiente por una semana o quizá más tiempo, pero es mejor mantener las muestras frescas y colocarlas tan pronto como sea posible en un congelador a 4° C (el tipo de congelador que usted tiene en casa, estará bien). Evite temperaturas extremas y la luz del sol directa. Las muestras podrán ser almacenadas en un congelador por muchos meses, sin problemas.
6. El análisis de los SWABS (cotonetes): Nosotros utilizamos la metodología de PCR cuantitativo, descrita por Boyle et al. (2004).

Etiquetado:

Los tubos deben de ser etiquetados por el primer colector, la última inicial debe ser seguida de una "S" de SWAB, y seguida por un número de tres dígitos, empezando por el 001. Por ejemplo, el colector Carlos Barajas, en su primer SWAB, el etiquetado debería ser: CBS001... Nosotros no asignamos ningún otro número de identificación al vial, por lo que no se debe de rehusar los números.

Otros datos:

Junto con el número de colecta también pueden ser colocados en el vial o en una libreta de campo: Identificación del sitio, Nombre del Sitio, Observaciones, Hora, Especie, Hábitat (pantano, río, charco), Estadio de Vida (larva, sub-adulto, adulto, Estadio según Gosner, Peso, Longitud Hocico-Cloaca (SVL), Sexo, Notas de la condición del animal (letárgico, irritable, respuesta de reflejos, etc.).

Análisis de SWABS (cotonetes):

Desafortunadamente, nuestro laboratorio no tiene los recursos para analizar los SWABS (cotonetes) para otros grupos de investigación. Las muestras tienen típicamente un costo aproximado de \$4-10 dólares por cada una, éste precio no incluye el costo de trabajo. Hasta que las máquinas de PCR cuantitativo lleguen a ser más comunes, creemos que bajarán los costos y que la técnica descrita por

Boyle et al. (2004) se aplicará más extensamente para medir, cuantificar y estudiar la extensión de la quitridiomycosis en el campo.

Bibliografía:

Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A. T., and Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 141-148.

Contactos:

Vance T. Vredenburg
Assistant Professor
Department of Biology
227 Hensill Hall
San Francisco State University
1600 Holloway Avenue
San Francisco, CA 94132
tel. (415) 338-7296
vancev@sfsu.edu

Cherie Briggs
Professor
Department of Ecology, Evolution, and Marine Biology
2112 Noble Hall
University of California, Santa Barbara
Santa Barbara, CA 93106-9610
briggs@lifesci.ucsb.edu