

INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM SALAMANDRIVORANS*

1. Ámbito de aplicación

La infección por *Batrachochytrium salamandrivorans* es una infección de los anfibios por el agente patógeno *Batrachochytrium salamandrivorans*, de la división Chytridiomycota y el orden Rhizophydiales.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. Agente etiológico

La cepa tipo del agente patógeno fúngico quitridio *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) es AMFP13/1. Se han descrito tres cepas más (Martel *et al.*, 2014) pero no se dispone de información sobre la estructuración genética o la variación fenotípica. Los análisis filogenéticos muestran que Bsal forma un clado con su especie hermana *B. dendrobatidis* (Martel *et al.*, 2013). El tamaño del genoma de la cepa tipo se determinó en 32,6 Mb con una predicción de 10 138 genes codificadores de proteínas (Farrer *et al.*, 2017). Actualmente no está clara la contribución de estas proteínas a la virulencia.

2.1.2. Supervivencia y estabilidad dentro de los tejidos del hospedador

Bsal es un agente patógeno intracelular que se desarrolla dentro de las células epidérmicas. La presencia de Bsal pudo demostrarse utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real en hisopos de piel dorsal hasta 7 días de media post-mortem y utilizando la histopatología del tejido de la piel dorsal hasta 3 días de media post-mortem (Thomas *et al.*, 2018). No está claro cuánto tiempo puede sobrevivir Bsal dentro de los tejidos de un hospedador muerto ni cuánto tiempo permanece infeccioso un hospedador muerto.

2.1.3. Supervivencia y estabilidad fuera del hospedador

Se ha demostrado que las esporas enquistadas permanecen infecciosas en el agua de los estanques durante al menos 31 días (Stegen *et al.*, 2017) y se consideran más resistentes en el medio ambiente en comparación con las zoosporas. Se demostró que el suelo forestal inoculado experimentalmente permanece infeccioso para la salamandra común durante 48 horas (Stegen *et al.*, 2017). Sin embargo, se detectó ADN de Bsal en el suelo forestal contaminado hasta 28 semanas después (Stegen *et al.*, 2017). No está claro si esto refleja la presencia de Bsal viable. No se ha estudiado el efecto de la desecación en la supervivencia de Bsal.

Pueden consultarse los métodos de inactivación en la sección 2.4.5

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles [en estudio]

Las especies que cumplen los criterios para figurar en la lista de susceptibles a la infección por Bsal según el Capítulo 1.5 del *Código Sanitario para los Animales Acuáticos* de la OIE (*Código Acuático*) están en estudio y podrían ser las siguientes:

Familia	Nombre científico	Nombre común
<i>Plethodontidae</i>	<i>Hydromantes strinatii</i>	Salamandra de las cavernas francesa
<i>Salamandridae</i>	<i>Cynops cyanurus</i>	Tritón de cola azul
	<i>Cynops pyrrhogaster</i>	Tritón de vientre de fuego japonés
	<i>Euproctus platycephalus</i>	Salamandra de arroyo sarda

Familia	Nombre científico	Nombre común
	<i>Ichthyosaura alpestris</i>	Tritón alpino
	<i>Lissotriton italicus</i>	Tritón italiano
	<i>Neureergus crocatus</i>	Tritón moteado amarillo
	<i>Nothophthalmus viridescens</i>	Tritón oriental
	<i>Paramesotriton deloustali</i>	Salamandra de Tam Dao
	<i>Pleurodeles waltl</i>	Tritón acanalado español
	<i>Salamandrina perspicillata</i>	Salamandra de anteojos del norte
	<i>Salamandra salamandra</i>	Salamandra de fuego
	<i>Taricha granulosa</i>	Tritón de piel rugosa

2.2.2. Especies con datos ambiguos sobre su susceptibilidad [en estudio]

Las especies para las que existen datos ambiguos sobre su susceptibilidad según el Capítulo 1.5. del Código Acuático son las siguientes: [en estudio]

2.2.3. Probabilidad de infección por especie, etapa de vida del hospedador, poblaciones y subpoblaciones

Bsal es un agente patógeno que afecta principalmente a los urodelos. Las pruebas de las infecciones experimentales y los brotes de la enfermedad en la naturaleza y en animales en cautividad demuestran que al menos la mayoría, si no todas, las especies de la familia *Salamandridae*, así como las especies de la familia *Hynobiidae* son susceptibles de infectarse cuando se exponen a Bsal. Sin embargo, existen diferencias en la susceptibilidad a la infección entre especies: por ejemplo, en el caso de las salamandras de fuego, se determinó que la dosis infecciosa de Bsal era una zoospora teórica, mientras que era necesaria una dosis significativamente mayor para infectar a los tritones alpinos (Stegen et al., 2017) y una especie del Paleártico occidental (*Lissotriton helveticus*) puede ser más resistente a la infección (Martel et al., 2014). Respecto a la familia más grande de salamandras (*Plethodontidae*), actualmente hay poca información; al menos una especie europea (*Speleomantes strinatii*) puede ser infectada, pero otras especies norteamericanas (*Gyrinophilus porphyriticus*, *Plethodon glutinosus*, *Ambystomatidae*) parecen ser menos susceptibles a la infección (Martel et al., 2014). La susceptibilidad de la familia *Cryptobranchidae* no está clara, y se ha encontrado una única infección en una salamandra gigante china (*Andrias davidianus*) cultivada (Zhiyong et al., 2018). No hay información sobre las familias de urodelos *Proteidae*, *Rhyacotritonidae* y *Amphiumidae*. La infección por Bsal en anuros solo se ha detectado en dos especies, en cautividad, en la naturaleza y en ensayos de laboratorio (Nguyen et al., 2017; Stegen et al., 2017).

Hasta ahora, las infecciones por Bsal solo se han demostrado en anfibios después de la metamorfosis. En un ensayo de infección experimental, las larvas de salamandras de fuego fueron expuestas a Bsal, pero no se infectaron (Van Rooij et al., 2015). Se desconoce hasta qué punto factores como la edad y el sexo afectan a la susceptibilidad a la infección tras la metamorfosis.

En Europa, se ha detectado Bsal en grupos de urodelos en cautividad (Fitzpatrick et al., 2018, Sabino-Pinto et al., 2015) y se ha planteado la hipótesis de que el comercio de mascotas de salamandras y tritones desempeña un papel central en la distribución de este hongo (Fitzpatrick et al., 2018; Yap et al., 2015; Zhiyong et al., 2018). Por lo tanto, los urodelos que entran en contacto con urodelos comercializados, ya sea directamente (a través del alojamiento conjunto o del contacto con animales salvajes, liberados o cautivos) o indirectamente (a través de materiales, agua o suelo contaminados), pueden tener una alta probabilidad de exposición a la infección por Bsal.

A los efectos de la Tabla 4.1, las larvas de salamandra con brotes branquiales pueden considerarse etapas tempranas de la vida, las larvas con branquias y extremidades desarrolladas o en desarrollo son juveniles y las salamandras con branquias y extremidades completamente desarrolladas son adultos.

2.2.4. Distribución del agente patógeno en el hospedador

Bsal sólo infecta la piel, donde permanece limitarse a la epidermis

2.2.5. Animales acuáticos reservorios de la infección

Un gran número de salamandras, principalmente pertenecientes a las familias *Salamandridae* y *Hynobiidae*, pueden sobrevivir a episodios de infección (por ejemplo, los tritones alpinos) o considerarse tolerantes, lo que da lugar a infecciones subclínicas persistentes. Aunque la infección persistente no se ha demostrado en todas las especies, en el área de distribución nativa de Bsal en el este de Asia, la infección y la dinámica de la enfermedad por Bsal parecen ser uniformes en todas las especies examinadas y estas parecen capaces de contraer infecciones persistentes a largo plazo (Laking *et al.*, 2017; Martel *et al.*, 2014; Zhiyong *et al.*, 2018).

En su área de distribución invasiva, las infecciones persistentes (por ejemplo, en los tritones alpinos) han intervenido en la extinción local de una especie altamente susceptible (salamandras de fuego). Actualmente no está claro cuál de las especies mencionadas en la sección 2.2.1 puede mantener infecciones persistentes en el área de distribución invasiva de Bsal. Al menos algunas especies (el ejemplo más conocido es la salamandra de fuego) son muy susceptibles y mueren invariablemente poco después de la exposición (Martel *et al.*, 2014; Stegen *et al.*, 2017), por lo que es poco probable que mantengan infecciones persistentes.

No se sabe si existen otros reservorios bióticos de Bsal.

2.2.6. Vectores

Hay pruebas de que las aves pueden ser portadoras de zoosporas adheridas a sus patas (Stegen *et al.*, 2017) y, por lo tanto, pueden actuar como vectores de Bsal.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mortalidad, morbilidad y prevalencia

En su área de distribución nativa en el este de Asia, se ha demostrado que el Bsal está presente en la naturaleza con una prevalencia de entre el 2 y el 4% de media (datos de China [Rep. Popular], Japón, Tailandia y Vietnam; Laking *et al.*, 2017; Martel *et al.*, 2014; Zhiyong *et al.*, 2018), pero no se ha observado morbilidad ni mortalidad en condiciones naturales. En algunas poblaciones (*Paramesotriton hongkongensis*), la prevalencia puede alcanzar el 50% (Zhiyong *et al.*, 2018). En su área de distribución invasiva en Europa, Bsal estaba presente en una población de salamandras de fuego con una prevalencia de entre el 25 y el 63% (Stegen *et al.*, 2017). Se ha detectado la presencia de Bsal y la mortalidad asociada en poblaciones de urodelos en cautividad de Europa, incluidos Alemania (1), el Reino Unido (4), Bélgica (1), los Países Bajos (2) y España (1) (el número entre paréntesis indica el número de poblaciones). Si no se trata, la morbilidad y la mortalidad pueden alcanzar el 100%, al menos en los miembros del género *Salamandra*.

La morbilidad, la mortalidad y la dosis infecciosa mínima varían considerablemente entre especies (Martel *et al.*, 2014; Stegen *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta los brotes naturales en cautividad y en la naturaleza y en los ensayos de infección, la tasa de morbilidad y mortalidad en las salamandras de fuego puede alcanzar el 100%, independientemente del nivel inicial de exposición a Bsal. Esto ha dado lugar a la pérdida de más del 99,9% de la población de salamandras de fuego en el lugar del brote índice de Bsal en los Países Bajos (Spitzen-van der Stuijs *et al.*, 2016). Todos los urodelos paleárticos occidentales analizados, excepto *Lissotriton helveticus* y *Salamandrella keyserlingii*, presentaron un 100% de morbilidad y mortalidad tras la exposición a una sola dosis alta de Bsal (Martel *et al.*, 2014). Sin embargo, al menos en el caso de los tritones alpinos, las tasas de morbilidad y mortalidad dependen de la dosis de Bsal a la que se expone el animal: una dosis alta da lugar a la mayor mortalidad, mientras que una dosis baja no produce necesariamente morbilidad ni mortalidad.

La morbilidad y la mortalidad también dependen de la temperatura ambiental. En el caso de la cepa tipo de Bsal, las temperaturas superiores a 20 °C reducen el nivel de infección y las temperaturas superiores a 25 °C acaban provocando la muerte de Bsal y la eliminación de la infección (Bloom *et al.*, 2015b). La exposición de animales infectados a condiciones que inhiben el crecimiento de Bsal puede, por lo tanto, dar lugar a infecciones no clínicas o subclínicas en especies susceptibles.

La coexistencia de especies altamente susceptibles, como las salamandras de fuego, con especies menos susceptibles, como los tritones alpinos, puede facilitar una dinámica de la enfermedad independiente de la densidad que conduzca a la extinción local de las especies altamente susceptibles (Stegen *et al.*, 2017).

2.3.2. Signos clínicos, incluidos cambios conductuales

La quitridiomycosis causada por Bsal puede ir acompañada de una combinación de los siguientes signos: ulceraciones epidérmicas (que van de discretas a extensas), muda de piel excesiva, hemorragias cutáneas y/o pérdida de líquidos a través de la piel, anorexia, apatía, posturas corporales anormales y convulsiones (Martel *et al.*, 2013).

2.3.3 Signos anatomopatológicos macroscópicos

Las anomalías cutáneas (hemorragias, ulceraciones, presencia de piel desprendida) son los principales hallazgos anatomopatológicos (Martel *et al.*, 2013).

2.3.4. Modos de transmisión y ciclo de vida

Los talos coloniales o monocéntricos de este hongo se desarrollan en el interior de las células epidérmicas del hospedador y producen zoosporas móviles o esporas amuralladas y enquistadas, ambas fases infecciosas. Las zoosporas se liberan a través de uno o varios tubos de secreción. Mientras que las esporas móviles nadan activamente hacia un sustrato adecuado (por ejemplo, un hospedador), las esporas enquistadas flotan en la interfaz agua-aire y se adhieren pasivamente a un hospedador que pase (Stegen *et al.*, 2017). *In vitro*, los talos en desarrollo forman finos rizoides. Los talos maduros *in vitro* tienen entre 16 y 50 µm de diámetro, e *in vivo* entre 7 y 17 µm; las zoosporas tienen aproximadamente 5 µm de diámetro. Las zoosporas móviles son más o menos esféricas, el núcleo se encuentra fuera de la masa ribosómica, con ribosomas agregados, múltiples mitocondrias y numerosos glóbulos lipídicos. La posición del centriolo no flagelado en las zoosporas de natación libre varía entre angular y paralela al cinetosoma (Martel *et al.*, 2013).

No hay indicios de transmisión vertical. Sin embargo, no se puede excluir en las especies que tienen crías metamorfoseadas (por ejemplo, *Salamandra atra*, *Salamandra lanzai*, *Lyciasalamandra helverseni*). La transmisión horizontal se produce por contacto directo o por contacto con suelo o agua contaminados (Stegen *et al.*, 2017). Las etapas infecciosas incluyen la zoospora móvil y las esporas enquistadas resistentes al medio ambiente (Stegen *et al.*, 2017). La infección pueden lograrse en condiciones experimentales aplicando tópicamente un inóculo de Bsal en el dorso de los anfibios y alojando a los animales a 15 °C (Martel *et al.*, 2013; 2014; Stegen *et al.*, 2017). Este inóculo puede contener zoosporas móviles o esporas inmóviles enquistadas.

Las vías de dispersión de Bsal dentro de Europa son poco conocidas, pero pueden ser antropogénicas (por ejemplo, a través de material contaminado). Las zoosporas se adhieren a las patas de las aves, lo que sugiere que las aves pueden propagar Bsal a grandes distancias (Stegen *et al.*, 2017). El contacto directo entre animales es necesario para la transmisión de Bsal: las salamandras separadas solo 1 cm de sus congéneres infectados no se infectaron en los ensayos de laboratorio, en contraste con los animales que cohabitaban (Spitzen-van der Sluijs *et al.*, 2018). En general, la capacidad de dispersión de Bsal en Europa actualmente parece limitada: se encontró que Bsal no se transmite a un sitio vecino en los Países Bajos, a pesar de estar aguas abajo de un pequeño arroyo, y la distribución actual de Bsal en Europa probablemente no sea continua (Spitzen-van der Sluijs *et al.*, 2018).

Aunque ahora se plantea la hipótesis de que la dispersión de Bsal entre poblaciones está mediada principalmente por el ser humano, otros factores (como por ejemplo, la fauna silvestre o el agua) pueden desempeñar papeles clave y actualmente se carece de conocimientos críticos sobre la dispersión de Bsal.

2.3.5. Factores medioambientales

La cepa tipo de Bsal, AMFP13/1, tolera temperaturas de hasta 25 °C, pero muere a temperaturas más altas (Bloo *et al.*, 2015b). Como se han demostrado infecciones por Bsal en tritones acuáticos a temperaturas del agua superiores a 25 °C (Laking *et al.*, 2017; Zhiyong *et al.*, 2018), es probable que la tolerancia térmica pueda depender del linaje de Bsal. Una temperatura de 4 °C da lugar a una progresión más lenta de la infección, pero no reduce la morbilidad o la mortalidad (Stegen *et al.*, 2017). Es probable que la desecación sea poco tolerada por Bsal, aunque actualmente no hay datos, y la espora enquistada puede ser resistente a la desecación (Stegen *et al.*, 2017; Van Rooij *et al.*, 2015). No se sabe hasta qué punto Bsal tolera la congelación.

2.3.6. Distribución geográfica

Asia se considera actualmente la región de origen de Bsal (Martel *et al.*, 2014), donde la infección parece ser endémica en las comunidades de anfibios en un amplio rango taxonómico, geográfico y ambiental, aunque con una baja prevalencia, de entre el 2 y el 4% (Zhiyong *et al.*, 2018). En Asia, se demostró que Bsal está ampliamente presente en poblaciones de urodelos en China (Rep. Popular), Japón, Tailandia y Vietnam. Se considera que el este de Asia es el rango nativo del hongo (Laking *et al.*, 2017; Martel *et al.*, 2014; Zhiyong *et al.*, 2018).

Europa se considera el área de distribución invasiva del hongo, donde Bsal se identificó por primera vez durante un episodio de mortalidad en salamandras de fuego de Bunderbos, Países Bajos (Martel *et al.*, 2013). En Europa, Bsal se detectó mediante estudios de especies silvestres susceptibles en Bélgica, Alemania y los Países Bajos (Martel *et al.*, 2014; Spitzen-van der Sluijs *et al.*, 2016), y en poblaciones de urodelos cautivos de Bélgica, Alemania, los Países Bajos, España y el Reino Unido (Fitzpatrick *et al.*, 2018; Sabino-Pinto *et al.*, 2015).

No se ha informado de la presencia de Bsal en África ni en América.

2.4. Estrategias de bioseguridad y de control de la enfermedad

2.4.1. Vacunación

No disponible.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas, incluidos agentes bloqueantes

Un tratamiento combinado con Polimixina E, voriconazol y un régimen de temperatura de 20 °C ha demostrado ser eficaz para erradicar Bsal de los hospedadores infectados (Bloom *et al.*, 2015c). Si el tratamiento no se realiza correctamente y no logra la erradicación, se crean portadores de bajo nivel y la probabilidad de detección por Bsal se reduce.

2.4.3. Inmunoestimulación

No disponible.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se dispone de información.

2.4.5. Métodos de inactivación

Bsal es sensible a una amplia variedad de desinfectantes (Van Rooij *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la inactivación con formalina dificulta la detección del ADN mediante la PCR en tiempo real. Bsal muere en 30 segundos en etanol al 70% (Van Rooij *et al.*, 2017). La inactivación en etanol al 70% permite realizar pruebas moleculares posteriores, pero es menos adecuada para la histopatología. La cepa tipo de Bsal, AMFP 13/1, muere a temperaturas superiores a los 25 °C; en consecuencia, la inactivación de este hongo puede lograrse mediante un tratamiento térmico en autoclave (Martel *et al.*, 2013).

2.4.6. Desinfección de huevos y larvas

No se dispone de información.

2.4.7. Prácticas generales de manejo

En cautividad, la detección del agente patógeno es difícil debido a la baja prevalencia en animales infectados subclínicamente que suelen ser portadores de Bsal a bajas intensidades (Martel *et al.*, 2014; Zhiyong *et al.*, 2018). Estos animales infectados subclínicamente suelen pertenecer, aunque no exclusivamente, a taxones de urodelos asiáticos. Las especies altamente susceptibles (como las salamandras de fuego) pueden desempeñar una función de centinela. Las pautas de temperatura en cautividad pueden interferir en gran medida con la detección de agentes patógenos. Las temperaturas superiores a 20 °C (e inferiores a 25 °C) perjudican gravemente la proliferación del agente patógeno en la piel del hospedador (Bloom *et al.*, 2015b) y pueden dar lugar a infecciones que no puedan detectarse.

El tratamiento térmico puede utilizarse para eliminar la infección por Bsal en especies de salamandras termotolerantes (Bloom *et al.*, 2015a).

Las barreras a la dispersión del agente patógeno, como por ejemplo las que impiden la migración de los hospedadores infectados, como las vallas para anfibios o las carreteras, o las que impiden la transmisión por parte de posibles vectores de Bsal, incluidos los seres humanos, los fómites y la fauna silvestre, pueden impedir la transmisión a pequeñas escalas espaciales (Spitzen-van der Sluijs *et al.*, 2018).

3. Selección de ejemplares y obtención, transporte y manipulación de las muestras

Esta sección se basa en la información de las secciones 2.2, 2.3 y 2.4 para identificar las poblaciones, los individuos y las muestras con mayor probabilidad de estar infectados.

3.1. Selección de las poblaciones y de los ejemplares

En los casos de enfermedad o mortalidad de los urodelos en cautividad, el muestreo debe centrarse principalmente en los animales enfermos o moribundos (es decir, los que presentan lesiones cutáneas y un comportamiento anormal). En una población con enfermedad y mortalidad continuas, se muestrean preferentemente los animales vivos pero enfermos. La segunda opción son los animales muertos. Solo deben muestrearse los animales recién muertos, ya que la detectabilidad de Bsal disminuye post-mortem (Thomas *et al.*, 2018). Sin embargo, en ausencia de animales enfermos o recién muertos, se pueden muestrear animales aparentemente sanos.

Del mismo modo, en las poblaciones silvestres, las muestras deben tomarse preferentemente de animales enfermos, moribundos o recién muertos; sin embargo, como es posible que estos sean eliminados rápidamente (es decir, a través de la depredación o el carroñeo), es posible que solo se disponga de animales sanos. Las poblaciones que han disminuido o en las que se han observado animales muertos deben ser objeto de estudio.

3.2. Selección de órganos y tejidos

El único tejido relevante es el tejido cutáneo, y probablemente sólo de anfibios después de la metamorfosis. Tanto las muestras invasivas (biopsias de piel) como las no invasivas (hisopos) son apropiadas, dado el desprendimiento apical de las esporas de Bsal. En los animales muertos, la piel dorsal es el tejido preferido, dado que su descomposición post mortem es más lenta (Thomas *et al.*, 2018).

3.3. Muestras o tejidos no adecuados para la detección del agente patógeno

Para la detección de Bsal en los anfibios solo es adecuada la piel.

3.4. Muestreo no letal

El muestreo no letal es posible, ya sea mediante la toma de biopsias de la piel (de los pies o de la cola) o mediante la recogida no invasiva de muestras utilizando hisopos. Se prefiere esta última opción por su mínimo impacto en el bienestar de los animales. Como Bsal se limita a las capas superficiales de la piel del anfibio hospedador, los resultados del muestreo no letal son equivalentes a los del letal. Se pueden tomar muestras de un gran número de animales utilizando hisopos de piel con efectos mínimos en el bienestar de los animales. Los hisopos deben frotarse firmemente sobre el abdomen (10 veces), la parte inferior de una pata (10 veces) y la cola ventral (10 veces) utilizando la punta del hisopo. Se recomienda encarecidamente el uso de guantes desechables para manipular los anfibios. Los hisopos deben ser transportados inmediatamente al laboratorio de diagnóstico o deben ser congelados hasta su traslado.

3.5. Conservación de muestras para el envío

3.5.1. Muestras para el aislamiento del agente patógeno

El aislamiento de Bsal es un procedimiento laborioso, que requiere hasta dos meses para obtener un cultivo puro a partir de una muestra clínica. El aislamiento a partir de animales muertos como consecuencia de la infección por Bsal se ve dificultado por el sobrecrecimiento bacteriano. La mejor muestra para el aislamiento de Bsal es un animal enfermo y vivo, al que se le practica la eutanasia justo antes de intentar el aislamiento. Antes del muestreo, los animales enfermos deben mantenerse a una temperatura de entre 5 y 15 °C para evitar la eliminación de la infección (Bloom *et al.*, 2015b)

3.5.2. Conservación de muestras para la detección molecular

Las muestras de tejido para la prueba PCR deben conservarse en etanol de grado analítico/reactivo (no desnaturalizado) al 70-90% (v/v). La proporción recomendada de etanol respecto a tejido es de 10:1. No se recomienda el uso de etanol de grado inferior (de laboratorio o industrial). Si el material no se puede fijar, se puede congelar.

Los hisopos de piel deben conservarse secos y preferiblemente congelados.

3.5.3. Muestras para histopatología, inmunohistoquímica o hibridación *in-situ*

Las muestras de piel para histopatología deben fijarse inmediatamente después de su recogida. La proporción recomendada de formol (10%) respecto a tejido es de 10:1.

3.5.4. Muestras para otras pruebas

No es aplicable.

3.6. Combinación de varias muestras

La combinación de hasta cuatro muestras de hisopos de piel parece permitir una detección fiable de Bsal en animales afectados clínicamente (Sabino-Pinto *et al.*, 2019a; 2019b), pero no se han determinado las estimaciones del impacto en el rendimiento diagnóstico de la prueba. Dada la baja intensidad de la infección en los animales infectados subclínicamente, se recomienda un muestreo y una realización de las pruebas sobre un solo animal cada vez.

4. Métodos de diagnóstico

Los métodos actualmente disponibles para identificar infecciones que pueden usarse en i) vigilancia de poblaciones aparentemente sanas, ii) propósitos de diagnóstico preliminar y iii) diagnóstico confirmatorio se enumeran en la Tabla 4.1. por etapa de la vida. Las designaciones utilizadas en la Tabla indican:

Clave:

- +++ = Método(s) recomendado(s) validado(s) para el propósito indicado y normalmente hasta la fase 3 de la Vía de Validación de la OIE;
- ++ = Método(s) adecuado(s) pero pueden precisar una validación posterior;
- + = Se puede utilizar en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad, la falta de validación u otros factores limitan mucho su aplicación;

Casillas sombreadas = No adecuado para este propósito.

La selección de una prueba para un propósito determinado depende de las sensibilidades y especificidades analíticas y de diagnóstico, así como de la repetibilidad y reproducibilidad del método. Los Laboratorios de Referencia de la OIE agradecen los comentarios sobre el rendimiento diagnóstico de las pruebas, en particular las PCR, sobre los factores que afectan la sensibilidad analítica o la especificidad analítica del ensayo, como los componentes tisulares que inhiben la amplificación, la presencia de bandas no específicas o inciertas, etc., y sobre cualquier ensayo que se encuentre en la categoría +++.

Tabla 4.1. Métodos de diagnóstico recomendados por la OIE y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y la investigación de animales afectados clínicamente

Método	A. Vigilancia de animales aparentemente sanos				B. Diagnóstico preliminar de animales afectados clínicamente				C. Diagnóstico confirmativo ¹ de un resultado sospechoso en la vigilancia o de un diagnóstico preliminar			
	Etapas de vida tempranas ²	Juveniles ²	Adultos	LV	Etapas de vida tempranas ²	Juveniles ²	Adultos	LV	Etapas de vida tempranas ²	Juveniles ²	Adultos	LV
Preparaciones húmedas	+	+	+	1	+	+	+	1				
Histopatología ³	+	+	+	1	++	++	++	1				
Cultivo celular									+	+	+	1
PCR en tiempo real	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3
PCR convencional												
Secuenciación del amplicón ⁴												
Hibridación <i>in situ</i>												
LAMP												
Prueba de flujo lateral					+	+	+	1				
Inmunohistoquímica												

LV = nivel de validación, relativo a la fase de validación en la Vía de la OIE (Capítulo 1.1.2); PCR = reacción en cadena de la polimerasa; LAMP = amplificación isotérmica mediada por bucle. ¹En el caso del diagnóstico confirmativo, debe aplicarse una combinación de varios métodos (véase el apartado 6). ²Las fases de vida temprana y juvenil se han definido en el apartado 2.2.3.

³La citopatología y la histopatología se pueden validar si se han comparado estadísticamente los resultados de distintos operadores.

⁴Secuenciación del producto de la PCR.

El sombreado indica que la prueba es inadecuada o que no debe utilizarse para este propósito

4.1. Preparaciones húmedas

Las preparaciones húmedas de raspados de piel o trozos de piel desprendida pueden examinarse con un aumento de 10x mediante microscopía óptica. La presencia de esporas móviles de aproximadamente 5 µm es indicativa de una infección por quitridios en anfibios.

4.2. Histopatología y citopatología

La histopatología de la piel de anfibio después de la metamorfosis puede proporcionar fuertes indicios de infección por Bsal. En los cortes teñidos con hematoxilina/eosina, las pruebas histopatológicas que sugieren infecciones por Bsal en la piel, necrosis epidérmica multifocal con pérdida de distinción entre las capas de queratinocitos asociada a multitud de talos fúngicos intracelulares y extracelulares de tipo quitrido, proporcionan pruebas histopatológicas de la infección por Bsal (Martel *et al.*, 2013; White *et al.*, 2016). Mediante la inmunohistoquímica se pueden teñir los talos de Bsal, lo que ayuda a detectar infecciones de bajo nivel (Thomas *et al.*, 2018). La histopatología es muy indicativa, pero no permite la identificación definitiva de Bsal, que necesita una confirmación adicional. En muestras de piel recogidas de forma aleatoria de salamandras infectadas experimentalmente, la histopatología permitió detectar Bsal solo en una minoría de las muestras (Thomas *et al.*, 2018). En los animales muertos, la descomposición post-mortem de la epidermis puede enmascarar las lesiones (Thomas *et al.*, 2018). Las lesiones pueden ser tan extensas, que la epidermis esté totalmente erosionada y no se pueda observar ningún talo fúngico. Las infecciones leves pueden pasar desapercibidas debido a las lesiones multifocales y pequeñas (Thomas *et al.*, 2018). En los animales infectados de forma subclínica, la sensibilidad del diagnóstico debe calificarse de baja. En animales afectados clínicamente, la sensibilidad y especificidad de la histopatología y la inmunohistoquímica no se han cuantificado.

No se dispone de informes sobre el uso de la citopatología.

4.3. Cultivo celular para el aislamiento

Bsal puede aislarse y cultivarse en medios artificiales, pero es un procedimiento laborioso y difícil que suele requerir entre 4 semanas y 2 meses. Asimismo, existe una importante probabilidad de sobrecrecimiento bacteriano, lo que dificulta el aislamiento fúngico, dando lugar a una escasa sensibilidad. Se puede utilizar el protocolo de Fisher *et al.* (2018). En primer lugar, deben limpiarse a fondo trozos pequeños (de aproximadamente 1 mm²) de piel de un animal infectado y enfermo, pasándolos por placas de agar. A continuación, cada uno de los trozos de piel limpios puede transferirse a un pocillo de una placa de 96 pocillos, que contenga caldo de hidrolizado de gelatina, triptona y lactosa (TGHl) con penicilina/estreptomina (200 mg/litro) y se incuba a 15°C. Los pozos que muestren crecimiento de quitridios sin contaminación bacteriana pueden utilizarse para el subcultivo (Martel *et al.*, 2013). El crecimiento del quitridio puede visualizarse examinando los pocillos con un microscopio invertido (con 10–40 aumentos).

Dadas las dificultades para aislar Bsal de animales infectados y la elevada incertidumbre para obtener un cultivo viable, este método no es apropiado como método de diagnóstico de rutina, pero en ciertos casos, muy infrecuentes, puede ser útil para confirmar la infección u obtener cepas para la investigación

4.4. Amplificación de ácido nucleico

4.4.1. PCR en tiempo real

La siguiente información procede de Blooi *et al.* (2013), Thomas *et al.* (2018) y Sabino Pinto *et al.* (2018). El ADN de los hisopos de piel puede extraerse utilizando kits comerciales de extracción de ADN. El ADN extraído se diluye diez veces para minimizar la posible inhibición de la PCR. Deben incluirse controles en cada ejecución de la prueba: al menos un control negativo de extracción y un control positivo; preferiblemente, se debe incluir un control interno de PCR. El control positivo consiste en extractos de ADN de una serie de diluciones a la décima parte de zoosporas de Bsal de 1 a 100.000 para permitir la cuantificación.

Una PCR TaqMan ha sido parcialmente validada hasta el nivel 3, sin embargo, no se ha indicado su finalidad (Thomas *et al.*, 2018). La PCR en tiempo real SYBR green, también puede utilizarse pero necesita una mayor validación para determinar su especificidad y sensibilidad (Martel *et al.*, 2013). La PCR TaqMan puede utilizarse como PCR simple o en combinación con cebadores para detectar *B. dendrobatidis* en una PCR dúplex (Blooi *et al.*, 2013) y utiliza el cebador directo STerF (5'-TGC-TCC-ATC-TCC-CCC-TCT-TCA-3'), el cebador inverso STR (5'-TGA-ACG-CAC-ATT-GCA-CTC-TAC-3') y la sonda marcada con Cy5 STerC (5'-ACA-AGA-AAA-TAC-TAT-TGA-TTC-TCA-AAC-AGG-CA-3') para detectar la presencia del gen 5.8S rRNA de Bsal. La eficiencia intra e interensayo fue del 95,7 y del 96%, respectivamente (Blooi *et al.*, 2013). Esta PCR dúplex TaqMan no disminuye la

detectabilidad ni de Bd ni de Bsal, excepto en caso de infecciones mixtas (Thomas *et al.*, 2018). Por lo tanto, se recomienda el uso de la PCR específica para Bsal simplex en caso de que se haya detectado Bd en la muestra. La sensibilidad de esta PCR en tiempo real está entre el 96 % y el 100% y la especificidad diagnóstica es del 100% (IC del 95%: 73-100%; Thomas *et al.*, 2018) cuando se utiliza en animales afectados clínicamente. Aunque se pueden detectar cantidades de ADN tan bajas como 0,1 equivalentes genómicos (GE) (Bloo *et al.*, 2013), Thomas *et al.* (2018) recomiendan un umbral de 1 equivalente genómico por reacción para reducir la probabilidad de falsos positivos. Los resultados limítrofes (≤ 1 GE por reacción) deben clasificarse como sospechosos y necesitan confirmación mediante secuenciación (o aislamiento).

Las muestras se ejecutan preferiblemente por duplicado. Una muestra se considera positiva si se obtiene la combinación de (1) la forma de las curvas de amplificación (2) resultados positivos en ambas duplicaciones, (3) valores de GE por encima del umbral de detección (1 GE por reacción), y (4) baja variabilidad entre duplicados (valor Ct < 0,3).

4.4.2. PCR convencional

No se han validado protocolos de PCR convencional.

4.4.3. Otros métodos de amplificación de ácido nucleico

Ninguno validado.

4.5. Secuenciación del amplicón

No se han validado protocolos de PCR convencional.

4.6. Hibridación *in situ*

No se han validado protocolos de hibridación *in-situ*.

4.7. Inmunohistoquímica

Im La inmunohistoquímica no es actualmente específica de Bsal, debido a la falta de anticuerpos específicos contra Bsal (Dillon *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2018).

4.8. Bioensayo

Ninguno disponible.

4.9. Métodos de detección basados en anticuerpos o antígenos

Se desarrolló un ensayo de flujo lateral (LFA) utilizando un anticuerpo monoclonal (MAb) IgM para detectar la infección en muestras de piel de anfibios. Este MAb no discrimina entre *B. salamandrivorans*, *B. dendrobatidis* y *Homolaphlyctis polyrhiza* (Dillon *et al.*, 2017). Es probable que la sensibilidad de esta prueba sea menor que la de la PCR en tiempo real (Dillon *et al.*, 2017): en ranas inoculadas experimentalmente con Bd, 1/5 animales resultaron positivos en el LFA en comparación con los 4/5 que dieron positivo al utilizar la PCR en tiempo real. Esto haría que esta técnica fuera más útil en animales con altas cargas de infección. Estas técnicas pueden ser útiles para las pruebas que se realizan el punto de atención si se aumenta la especificidad y se proporciona una validación exhaustiva.

4.10. Otros métodos

No es aplicable.

5. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia destinada a demostrar ausencia de la enfermedad en poblaciones aparentemente sanas

Para la vigilancia se recomienda el uso de PCR en tiempo real en hisopos cutáneos.

6. Criterios de diagnóstico confirmativo

Esta sección sólo aborda los resultados de las pruebas de diagnóstico para la detección de la infección en ausencia (sección 6.1) o en presencia de signos clínicos (sección 6.2), pero no evalúa si el agente infeccioso es la causa del episodio clínico.

Las definiciones de caso sospechoso y confirmado tienen por objetivo apoyar la toma de decisiones relacionadas con el comercio y la confirmación del estatus de la enfermedad a nivel de país, zona o compartimento. Las definiciones de caso confirmado de la enfermedad en áreas endémicamente afectadas pueden ser menos estrictas.

6.1. Animales aparentemente sanos o animales de estado sanitario desconocido¹

Las poblaciones aparentemente sanas pueden caer bajo sospecha, y por lo tanto ser muestreadas, si existe un vínculo epidemiológico con una población infectada. La proximidad geográfica a una población que se sabe que está infectada, o el desplazamiento de animales o productos animales o equipos, etc. a tal población, equivalen a un vínculo epidemiológico. Por otra parte, se toman muestras de poblaciones sanas en estudios destinados a demostrar la ausencia de la enfermedad.

Estos estudios suelen consistir en un muestreo no invasivo mediante hisopos de piel que se examinan para detectar la posible presencia de Bsal mediante PCR en tiempo real. Cuando se aplican a animales silvestres, la confirmación mediante una técnica complementaria, que no sea la secuenciación del producto de la PCR, no suele ser factible.

6.1.1. Definición de caso sospechoso en animales aparentemente sanos

Se sospechará la presencia de infección por Bal si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Resultado positivo en una PCR en tiempo real;
- ii) Alteraciones histopatológicas compatibles con la presencia del agente patógeno o la enfermedad;
- iii) La presencia de esporas móviles, compatibles con zoosporas de quitridios, en preparaciones húmedas de piel de urodelo.

6.1.2. Definición de caso confirmado en animales aparentemente sanos

La presencia de infección por Bal se confirmará si se cumplen, además de los criterios de la Sección 6.1.1, uno o varios de los siguientes criterios:

- i) Resultado positivo en una PCR en tiempo real;
- ii) Aislamiento del agente patógeno de la piel en cultivo e identificación mediante PCR en tiempo real.

6.2. Animales afectados clínicamente

Los signos clínicos no son patognomónicos de la una sola enfermedad; no obstante, pueden acotar el rango de posibles diagnósticos.

6.2.1. Definición de caso sospechoso en animales afectados clínicamente

Se sospechará la presencia de infección por Bal si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Signos clínicos (hemorragias, ulceraciones, presencia de piel desprendida, véase el apartado 2.3.2), especialmente la presencia de úlceras cutáneas y/o disecdisis;
- ii) Resultado positivo en una PCR en tiempo real;
- iii) Alteraciones histopatológicas compatibles con la presencia del agente patógeno o la enfermedad;
- iv) Observación visual (por microscopía) de esporas móviles, compatibles con zoosporas de quitridios de anfibios, en una preparación húmeda de la piel de al menos un urodelo enfermo;
- v) Resultado positivo en la detección de antígeno mediante LFA.

¹ Por ejemplo, *mercancías* transfronterizas.

6.2.2. Definición de caso confirmado en animales afectados clínicamente

Se confirmará la presencia de infección por Bal si se cumple, además de los criterios de la Sección 6.2.1, al menos uno de los siguientes criterios

- i) Resultado positivo en una PCR en tiempo real;
- ii) Aislamiento del agente patógeno de la piel en cultivo e identificación mediante PCR en tiempo real.

6.3. Sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico

El rendimiento diagnóstico de las pruebas recomendadas para la vigilancia o el diagnóstico de la infección por Bal figura en la Tabla 6.3.1. Esta información puede utilizarse para el diseño de encuestas sobre la infección por Bal; sin embargo, debe tenerse en cuenta que el rendimiento diagnóstico es específico de las circunstancias de cada estudio de rendimiento diagnóstico (incluidos el propósito de la prueba, la población de origen, los tipos de muestras tisulares y las especies hospedadoras), y que puede variar según las condiciones. Los datos sólo se presentan cuando las pruebas están validadas al menos al nivel dos de la vía de validación descrita en el capítulo 1.1.2 y se dispone de datos en los estudios de precisión diagnóstica publicados.

Tabla 6.3.1. Rendimiento diagnóstico de las pruebas recomendadas para la vigilancia o el diagnóstico

Tipo de prueba	Propósito de la prueba	Poblaciones de origen	Tipo de tejido o muestra	Especie	DSe (n)	DSp (n)	Prueba de referencia	Cita
PCR en tiempo real	Diagnóstico	Salamandras infectadas de forma experimental (infección clínica y subclínica)	Hisopos cutáneos	<i>Salamandra salamandra</i>	96–100 (26)	100 (12)	PCR digital en gotas	Thomas <i>et al.</i> (2018)

DSe = sensibilidad diagnóstica; DSp = especificidad diagnóstica; n = número de muestras utilizadas en el estudio.

7. Bibliografía

- BLOOI M., MARTEL A., HAESBROUCK F., VERCAMMEN F., BONTE D. & PASMANS F. (2015a). Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Sci. Rep.*, **5**, 8037. <https://doi.org/10.1038/srep08037>
- BLOOI M., MARTEL A., VERCAMMEN F., HAESBROUCK F. & PASMANS F. (2015b). Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Sci. Rep.*, **5**, 8037.
- BLOOI M., PASMANS F., LONGCORE J.E., SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., VERCAMMEN F. & MARTEL A. (2013). Duplex real-time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. *J. Clin. Microbiol.*, **51**, 4173–4177.
- BLOOI M., PASMANS F., ROUFFAER L., HAESBROUCK F., VERCAMMEN F. & MARTEL A. (2015c). Successful treatment of *Batrachochytrium salamandrivorans* infections in salamanders requires synergy between voriconazole, polymyxin E and temperature. *Sci. Rep.*, **5**, 11788.
- DILLON M.J., BOWKETT A.E., BUNGARD M.J., BECKMAN K.M., O'BRIEN M.F., BATES K., FISHER M.C., STEVENS J.R. & THORNTON C.R. (2017). Tracking the amphibian pathogens *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* using a highly specific monoclonal antibody and lateral-flow technology. *Microb. Biotechnol.*, **10**, 381–394.
- FARRER R.A., MARTEL A., VERBRUGGHE E., ABOUELLEIL A., DUCATTELLE R., LONGCORE J.E., JAMES T.Y., PASMANS F., FISHER M.C. & CUOMA C.A. (2017). Evolutionary innovations underpin niche-specific infection strategies across emerging pathogenic chytrid fungi. *Nat. Commun.*, **8**, 14742. doi: 10.1038/ncomms14742.
- FISHER M.C., GHOSH P., SHELTON J.M.G., BATES K., BROOKES L., WIERZBICKI C., ROSA G.M., FARRER R.A., AANENSEN D.M., ALVARADO-RYBAK M., BATAILLE A., BERGER L., BÖLL S., BOSCH J., CLARE F.C., COURTOIS E., CROTTINI A., CUNNINGHAM A.A., DOHERTY-BONE T.M., GEBRESENBET F., GOWER D.J., HÖGLUND J., JAMES T.Y., JENKINSON T.S., KOSCH T.A., LAMBERTINI C., LAURILA A., LIN C.F., LOYAU A., MARTEL A., MEURLING S., MIAUD C., MINTING P.,

- NDRIANTSOA S., O'HANLON S., PASMANS F., RAKOTONANAHARY T., RABEMANANJARA F.C.E., RIBEIRO L.P., SCHMELLER D.S., SCHMIDT B.R., SKERRATT L., SMITH F., SOTO-AZAT C., TESSA G., TOLEDO L.F., VALENZUELA-SÁNCHEZ A., VERSTER R., VÖRÖS J., WADMAN B., WEBB R.J., WELDON C., WOMBWELL E., ZAMUDIO K.R., LONGCORE J.E. & GARNER T.W.J. (2018). Development and worldwide use of non-lethal, and minimal population-level impact, protocols for the isolation of amphibian chytrid fungi. *Sci. Rep.*, **8**, 7772. doi: 10.1038/s41598-018-24472-2.
- FITZPATRICK L., PASMANS F., MARTEL A. & CUNNINGHAM A.A. (2018). Epidemiological tracing of *Batrachochytrium salamandrivorans* identifies widespread infection and associated mortalities in private amphibian collections. *Sci. Rep.*, **8**, 13845.
- LAKING A.E., NGO H.N., PASMANS F., MARTEL A. & NGUYEN T.T. (2017). *Batrachochytrium salamandrivorans* is the predominant chytrid fungus in Vietnamese salamanders. *Sci. Rep.*, **7**, 44443. doi: 10.1038/srep44443
- 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., BOSCH J., LÖTTTERS S., WOMBWELL E., GARNER T.W.J., SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., SALVIDIO S., DUCATELLE R., NISHIKAWA K., NGUYEN T.T., VAN BOCXLAER I., BOSSUYT F. & PASMANS F. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science*, **346**, 630–631.
- 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. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **110**, 15325–15329.
- NGUYEN T.T., NGUYEN T.V., ZIEGLER T., PASMANS F. & MARTEL A. (2017). Trade in wild anurans vectors the urodelan pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* into Europe. *Amphibia-Reptilia*, **38**, 554–556. doi: 10.1163/15685381-00003125
- SABINO-PINTO J., BLETZ M., HENDRIX R., PERL R.G.B., MARTEL A., PASMANS F., LÖTTTERS S., MUTSCHMANN F., SCHMELLER D.S., SCHMIDT B.R., VEITH M., WAGNER N., VENCES M. & STEINFARTZ S. (2015). First detection of the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in Germany. *Amphibia-Reptilia*, **36**, 411–416.
- SABINO-PINTO J., TOBIAS KRAUSE E., BLETZ M.C., MARTEL A., PASMANS F., STEINFARTZ S. & VENCES M. (2019a). Detectability vs. time and costs in pooled DNA extraction of cutaneous swabs: a study on the amphibian chytrid fungi. *Amphibia-Reptilia*, **40**, 29-39.
- SABINO-PINTO J., MARTEL A., PASMANS F., STEINFARTZ S. & VENCES M. (2019b). Pooling skin swabs does not inhibit qPCR detection of amphibian chytrid infection. *Plos One* **14**, e0214405
- SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., MARTEL A., ASSELBERGHS J., BALES E.K., BEUKEMA W., BLETZ M.C., DALBECK L., GOVERSE E., KERRES A., KINET T., KIRST K., LAUDELOUT A., MARIN D.A., FONTE L.F., NÖLLERT A., OHLHOFF D., SABINO-PINTO J., SCHMIDT B.R., SPEYBROECK J., SPIKMANS F., STEINFARTZ S., VEITH M., VENCES M., WAGNER N., PASMANS F. & LÖTTTERS S. (2016). Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, **22**, 1286–1288.
- SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., STEGEN G., BOGAERTS S., CANESSA S., STEINFARTZ S., JANSSEN N., BOSMAN W., PASMANS F. & MARTEL A. (2018). Post-epizootic salamander persistence in a disease-free refugium suggests poor dispersal ability of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Sci. Rep.*, **8**, 3800.
- STEGEN G., PASMANS F., SCHMIDT B.R., ROUFFAER L.O., VAN PRAET S., SCHAUB M., CANESSA S., LAUDELOUT A., KINET T., ADRIAENSEN C., HAESBROUCK F., BERT W., BOSSUYT F. & MARTEL A. (2017). Drivers of *Batrachochytrium salamandrivorans* mediated salamander extirpation. *Nature*, **544**, 353–356. doi: 10.1038/nature22059
- THOMAS V., BLOOI M., VAN ROOIJ P., VAN PRAET S., VERBRUGGHE E., GRASSELLI E., LUKAC M., SMITH S., PASMANS F. & MARTEL A. (2018). Recommendations on diagnostic tools for *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Transbound. Emerg. Dis.*, **65**, e478-e488.
- VAN ROOIJ P., MARTEL A., HAESBROUCK F. & PASMANS F. (2015). Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Vet. Res.*, **46**, 137.
- VAN ROOIJ P., PASMANS F., COEN Y. & MARTEL A. (2017). Efficacy of chemical disinfectants for the containment of the salamander chytrid fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*. *PLoS One*, **12**, e0186269. doi: 10.1371/journal.pone.0186269

WHITE L.W., FORZÁN M.J., PESSIER A.P., ALLENDER M.C., BALLARD J.R., CATENAZZI A., FENTON H., MARTEL A., PASMANS F., MILLER D.L., OSSIBOFF R.J., RICHGELS K.L.D. & KERBY J.L. (2016). Amphibian: a case definition and diagnostic criteria for *Batrachochytrium salamandrivorans* chytridiomycosis. *Herpetol. Rev.*, **47**, 207.

YAP T.A., KOO M.S., AMBROSE R.F., WAKE D.B. & VREDENBURG V.T. (2015). Biodiversity: Averting a North American biodiversity crisis. *Science*, **349**, 481–482.

ZHIYONG Y., MARTEL A., WU J., VAN PRAET S., CANESSA S. & PASMANS F. (2018). Widespread occurrence of an emerging fungal pathogen in heavily traded Chinese urodelan species. *Conserv. Lett.*, 11: e12436.

*
* *

NB: Actualmente (2021) no existe ningún Laboratorio de Referencia de la OIE para la infección por *Batrachochytrium salamandrivorans* (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2021.