

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS* EN ANFIBIOS DE LAS REGIONES ANDINA CENTRAL, ORIENTAL, ORINOQUIA Y AMAZONIA DE COLOMBIA

ALEXANDRA VÁSQUEZ-OCHOA¹, PILAR BAHAMÓN CARMONA², LUIS DANIEL PRADA SALCEDO¹ y MARCELA FRANCO-CORREA^{1,3}

¹Unidad de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 No. 40-62, Bogotá, Colombia.

²Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7 No. 40-62, Bogotá, Colombia.

Resumen: Detectamos la presencia de zoosporas del hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore *et al.* 1999) en la piel de anfibios encontrados en 3 localidades de los departamentos de Boyacá y Cundinamarca, Colombia. De 336 individuos muestreados, 3 fueron positivos a la presencia del patógeno, los cuales pertenecen a las familias Leptodactylidae y Hylidae. Este trabajo es el primer reporte de detección y cuantificación de zoosporas de *B. dendrobatidis* en el país utilizando la técnica de PCR en tiempo real (qPCR), donde los resultados obtenidos evidenciaron una baja carga fúngica en los anuros positivos a la presencia del hongo.

Palabras Clave: Quitridiomycosis, PCR en Tiempo Real, Boyacá, Cundinamarca.

Abstract: A. Vasquez-Ochoa, P. Bahamón Carmona, L.D. Prada Salcedo and M. Franco-Correa. "Detection and quantification of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians of the Central and Eastern Andean, Orinoco and Amazon regions of Colombia". We detected the presence of zoospores from the amphibian fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians from 3 sites in the Boyacá and Cundinamarca departments of Colombia. Of the 336 individuals sampled, 3 tested positive for the presence of the pathogen; these belong to the Leptodactylidae and Hylidae families. This work is the first report of detection and quantification of zoospores of *B. dendrobatidis* in the country using the PCR technique in real time, where the results obtained showed a low fungal burden in the anuran positive for the presence of the fungus.

Key words: Chytridiomycosis, Real Time PCR, Boyacá, Cundinamarca.

INTRODUCCION

En los últimos años los anfibios se han enfrentado a diversos factores que han diezmando sus poblaciones; se ha propuesto que estamos en medio de la sexta extinción masiva ya que se ha evidenciado que muchas especies de anfibios están amenazadas y otras ya se encuentran extintas (Wake y Vredenburg 2008). Uno de los principales factores implicados en este declive poblacional son las enfermedades emergentes como la quitridiomycosis, la cual es ocasionada por el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore *et al.* 1999). Este patógeno se caracteriza por colonizar las superficies queratinizadas de los anfibios, desarrollando alteraciones a las estructuras del disco bucal de los estados metamórficos y alteraciones en la epidermis de los juveniles y adultos que en muchas ocasiones pueden causar la muerte (Berger *et al.* 1998). *B. dendrobatidis* es generalista, y afecta diversas especies de anfibios principalmente aquellos que están asociados a cuerpos de agua en su modo reproductivo, además es de fácil propagación, debido a la motilidad de sus zoosporas

durante la fase acuática de su ciclo de vida (Berger *et al.* 2005a). Presenta diversos factores de virulencia (Berger *et al.* 2005b) y un amplio margen de tolerancia en condiciones medioambientales (Ron *et al.* 2003); adicionalmente puede devastar poblaciones y ocasionar muertes masivas en especies silvestres, como lo ocurrido en Australia entre 1993-1994 y Panamá entre 1996-1997 (Berger *et al.* 1998). También se ha demostrado experimentalmente que *B. dendrobatidis* es letal en algunas especies como la *Rana muscosa*, *Rana sierrae* y *Lithobates areolatus* cuando la carga fúngica es mayor a 10⁴ equivalentes de zoosporas por hisopo (Vredenburg *et al.* 2010; Briggs *et al.* 2010; Kinney *et al.* 2011).

A pesar que el primer reporte de quitridiomycosis en el mundo se remonta a 1998 (Berger *et al.* 1998), aún no se ha podido establecer cómo *B. dendrobatidis* se ha distribuido a nivel mundial. Se cree que el patógeno ha sido diseminado por la introducción de especies foráneas, como las ranas *Xenopus laevis* y *Lithobates catesbeianus*, las cuales ya han sido reportadas como portadoras

³ Send correspondence to / Enviar correspondencia a: franco@javeriana.edu.co

del hongo en países suramericanos como Venezuela, Argentina y Chile, entre otros (Bonaccorso *et al.* 2003; Hanselmann *et al.* 2004; Sanchez *et al.* 2008; Solis *et al.* 2010; Ghirardi *et al.* 2011). Adicionalmente, se ha propuesto que el desplazamiento humano por las zonas contaminadas y que algunas aves acuáticas cumplen un rol importante como reservorios del hongo, transportando las zoosporas a nuevas localidades (Rachowicz *et al.* 2005; Fisher y Garner 2007; Garmyn *et al.* 2012). Otros autores han sugerido que la aparición de la enfermedad se debe a cambios en el comportamiento del patógeno, alteraciones en el sistema inmunológico de las especies, y a la creación de entornos más favorables para *B. dendrobatidis*, como variaciones en el medio ambiente relacionadas con condiciones de sequía que pueden aumentar los niveles de infección y la vulnerabilidad de las especies al hongo (Rachowicz *et al.* 2005; Fisher y Garner 2007; Longo *et al.* 2010).

En Colombia la presencia del hongo no ha sido muy documentada a pesar de ser uno de los países con mayor diversidad de anfibios y un alto endemismo poblacional (Acosta-Galvis 2000). El primer reporte en Colombia se realizó en ejemplares de colección, utilizando técnicas histológicas (Berger *et al.* 1999), las cuales revelaron que, de 673 individuos, cinco animales colectados en los departamentos de Santander y Cundinamarca estaban infectados por el patógeno (Ruiz y Rueda-Almonacid 2008). El segundo reporte se realizó en la Cordillera Occidental en el Departamento del Valle del Cauca, donde se analizaron 466 individuos por técnicas histológicas, de los cuales 22 especímenes evidenciaron la presencia de esporangios en el estrato córneo (Velásquez *et al.* 2008). Adicionalmente, la Universidad de los Andes, Colombia, realizó estudios en localidades de la Región Andina Oriental en 222 anfibios, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, logrando detectar zoosporas de *B. dendrobatidis* en 16 individuos (Quintero 2008). Debido a la escasa información y a que los diagnósticos actualmente publicados se han realizado mediante análisis histológico (cuya técnica es invasiva y requiere de mucha experiencia por parte del investigador, que dificulta el dictamen de la enfermedad) y por PCR convencional (la cual presenta poca sensibilidad principalmente en la detección de muestras obtenidas de anfibios silvestres), se realizó el siguiente estudio, cuyo objetivo fue detectar el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en comunidades de anfibios de localidades pertenecientes a las regiones Andina Central, Oriental, Orinoquia y Amazonia de Colombia, utilizando protocolos moleculares como la PCR en tiempo real (qPCR), cuya técnica permite diagnosticar y cuantificar la enfermedad desde una zoospora en adelante, a partir del cuarto día de post infección (Boyle *et al.* 2004; Hyatt *et al.* 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La toma de muestras de la población de anfibios se realizó en 12 municipios pertenecientes a las regiones Andina Central y Oriental, Orinoquia y Amazonia de Colombia, en un rango altitudinal entre

los 200 y los 3549 m.s.n.m. (Fig1) con temperaturas promedio entre 11°C – 30°C y humedad relativa entre 62% y 96% (Tabla 1).

Procedimientos Metodológicos

Los anfibios fueron capturados al inicio de la temporada de lluvias, en diferentes microhábitats que incluían bosques, pastizales, esteros y charcas, entre los meses de mayo de 2009 y diciembre de 2010, durante el día (para especies diurnas) y la noche (para especies nocturnas) por el método de relevo por encuentro visuales (REV) descrito por Rueda-Almonacid *et al.* (2006). Los individuos fueron manipulados utilizando guantes de nitrilo para cada espécimen, con el fin de evitar contaminación cruzada (Hyatt *et al.* 2007). Posteriormente se realizó la toma de muestras según el protocolo de Vredenburg y Briggs (2004/2007), utilizando hisopos previamente esterilizados frotando el parche ventral, la superficie dorsal, las extremidades y el interior de los dedos, 20 veces por duplicado. Posteriormente, los hisopos destinados para el análisis molecular se introdujeron individualmente en un ependorff de 1.5 mL que contenía 300µl de etanol al 70%, luego fueron refrigerados a 4°C para su conservación y transporte. Los anfibios fueron liberados después de la toma de los siguientes datos: a) Fecha y hora de captura, b) Condiciones climáticas y ambientales (altitud, % humedad, temperatura), c) Especie.

Los hisopos que contenían el etanol para la conservación de la muestra se dejaron evaporar a temperatura ambiente en una cabina de extracción durante un lapso de 30 a 48 horas; posteriormente, a cada uno se le adicionó 50µl de reactivo PrepMan Ultra (Applied Biosystems®) siguiendo las indicaciones de la casa matriz.

El ADN extraído fue cuantificado en un Nanodrop Thermo Scientific® 2000c y las muestras fueron procesadas según la técnica descrita por Boyle *et al.* (2004) mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando una sonda taqman, amplificando una secuencia de ADNr perteneciente a la región ITS-1 y la subunidad 5.8s. Debido a que el equipo utilizado fue Light Cycler® 1.5 de Roche® se modificaron las condiciones de amplificación las cuales fueron: un ciclo de pre-incubación (a 95°C por 10 min), 50 ciclos de denaturación (a 95°C por 15 seg), hibridación (a 60°C por 1min), elongación (a 72°C por 2 seg) y un ciclo de enfriamiento (a 40°C por 30 seg). Cada muestra se analizó por duplicado, realizando repeticiones a aquellas que presentaban lecturas mayores a 10⁰zoosporas·µL⁻¹ para confirmar el resultado positivo. Para la cuantificación de las muestras positivas, se realizó una curva de calibración por triplicado de cada dilución de zoosporas, las cuales se prepararon a partir del estándar proveniente de *Australian Animal Health Laboratory, CSIRO Livestock Industries, Private Bag 24, Geelong, Victoria 3220, Australia* utilizando concentraciones de 10³, 10², 10¹, y 10⁰ zoosporas·µL⁻¹ y agua purificada MilliQ® de Roche® como blanco.

Para medir la probabilidad de que las variables ambientales tomadas durante el muestreo (altitud, temperatura y % humedad; Tabla 1), se encontraran asociadas con la presencia o ausencia del patógeno, se realizó una regresión logística binaria. Adicionalmente se realizó una regresión lineal simple con cada una de las variables, para determinar si existe una relación entre la altitud, temperatura, y % de humedad, con la concentración de zoosporas, utilizando

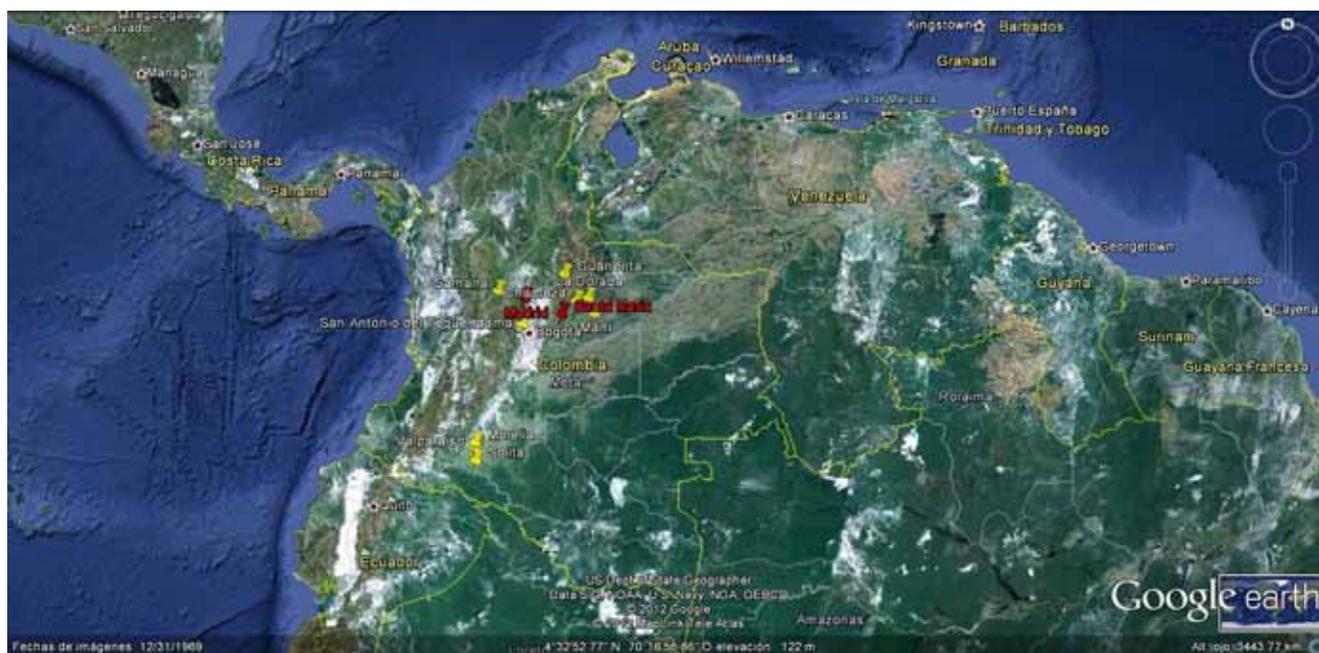


FIG. 1. Mapa de Colombia que muestra los municipios determinados para el muestreo de zoosporas de *Bd* en anfibios del país. En rojo: municipios donde se encontraron zoosporas en tres localidades. En amarillo: municipios donde no se detectó el hongo. Imagen tomada de Google Earth 2011.

*Map of Colombia showing the particular municipalities for the sampling of *Bd* zoospores in amphibians of the country. In red: municipalities where zoospores were found in three locations. In yellow: municipalities where the fungus was not detected. Image taken from Google Earth 2011.*

para ello el programa para Windows IBM® SPSS Statistics 1.8®, con licencia perteneciente a la Pontificia Universidad Javeriana.

RESULTADOS

Se tomó un total de 336 muestras, representadas en 57 especies de anfibios correspondientes a los tres órdenes (Gymnophiona (1), Caudata (5), y Anura (330) (Tabla 2). Ninguno de los anfibios presentó signos aparentes de quitridiomicosis, como letargo, posición del cuerpo anormal, pérdida de reflejos o anorexia (Berger *et al.* 1998; Nichols *et al.* 2001); tampoco se encontraron individuos muertos o muertes masivas durante los muestreos. Tres especies (*Leptodactylus colombiensis* Heyer, 1994), *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863) y *Dendropsophus mathiassoni* (Cochran y Goin, 1970) fueron positivas a la presencia de *B. dendrobatidis* (Tabla 3).

Los valores arrojados por la regresión logística binaria no fueron significativos, lo que indica que no existe una relación entre la altitud ($P=0.609$), la temperatura ($P=0.162$) y la humedad ($P=0.868$) con la presencia de *B. dendrobatidis*. En cuanto a la relación con la concentración de zoosporas y estas variables, los valores de la regresión lineal simple tampoco fueron estadísticamente significativos [(altitud ($P=0.435$), temperatura ($P=0.97$) y humedad relativa ($P=0.958$)).

Por su parte, las localidades que evidenciaron la presencia de *B. dendrobatidis* se encuentran ubicadas en la Cordillera Oriental, en los municipios de Santa María (Boyacá) y Madrid (Cundinamarca) (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Durante el estudio se detectó la presencia de *B. dendrobatidis* en sólo tres especies de anfibios a pesar del alto número de individuos muestreados (336). Los resultados obtenidos mediante PCR en tiempo real (qPCR) evidenciaron bajas concentraciones de zoosporas en las tres muestras positivas, las cuales se encontraron por debajo de la *regla de las 10⁴ zoosporas* propuesta por Vredenburg *et al.* (2010), cuyo modelo sugiere que valores mayores o iguales a esta concentración pueden ocasionar la muerte a los anfibios (Vredenburg *et al.* 2010; Briggs *et al.* 2010; Kinney *et al.* 2011). Resultados similares a la baja carga de zoosporas también fue evidenciada en la Provincia de Yunnan, China, donde Bai *et al.* (2010) determinaron concentraciones de aproximadamente 598.3 equivalentes. Adicionalmente, Swei *et al.* (2011), realizaron un estudio de campo en localidades de 15 países de Asia y de Papúa (Nueva Guinea), donde se tomaron 3363 muestras de las cuales se evidenció una baja prevalencia y concentraciones por debajo de la *regla de 10⁴ zoosporas* (Briggs *et al.* 2010).

Muchos factores pueden estar asociados con el bajo número de individuos positivos y con la baja concentración detectada; entre las posibles causas se encuentran: que los ejemplares posiblemente se hallaban en las etapas iniciales de la enfermedad donde no se evidencia sintomatología, o por las mudas excesivas de piel que se presentan cuando ya se han infectado (Hyatt *et al.* 2007). También puede deberse a los diversos factores de virulencia presentados

por *B. dendrobatidis* (Berger *et al.* 2005b; Voyles *et al.* 2011), a la presencia de posibles péptidos relacionados con el sistema inmunológico de los anfibios (Rollins-Smith y Conlon 2005, Conlon *et al.* 2009) o a las relaciones simbiotas mutualistas que se pueden formar entre los individuos y la flora acompañante (Brucker *et al.* 2008a; Brucker *et al.* 2008b; Harris *et al.* 2009). Adicionalmente, se pudo presentar falsos negativos debido a la presencia de posibles inhibidores ya que las muestras obtenidas son ambientales y van acompañadas de contaminantes (hojas, barro y demás residuos sólidos) que pueden alterar la sensibilidad de la PCR en tiempo real.

Los resultados estadísticos indican que no hay una relación significativa entre la presencia del patógeno y la concentración de zoosporas con las variables tomadas durante el muestreo (altitud, humedad relativa y temperatura), lo cual se debe al bajo número de individuos que fueron detectados como positivos. En cuanto a la altitud, hay discrepancia entre la relación de esta variable con la presencia de *B. dendrobatidis* y la concentración de zoosporas; algunos autores siguieron que el desarrollo y el crecimiento del patógeno no depende de la altitud (Drew *et al.* 2007; Puschendorf *et al.* 2009; Kriger *et al.* 2007) ya que el hongo se ha detectado desde el nivel del mar, en países como Puerto Rico y en Ecuador (Burrowes *et al.* 2004; McCracken *et al.* 2009) hasta altitudes de 5348 m.s.n.m., como en los Andes peruanos (Seimon *et al.* 2007). Sin embargo, Pounds *et al.* (2006) proponen que los anfibios de tierras medias son más propensos al contagio y a la enfermedad, ya que altitudes inferiores presentan altas temperaturas durante el día y las altitudes superiores son muy frías durante la noche para el desarrollo del hongo quitridio; así mismo, Sánchez *et al.* (2008) vinculan la altitud con la concentración de zoosporas y la prevalencia de la enfermedad en la Cordillera de Mérida en Venezuela, mientras que Longo y Burrowes (2010) sugieren que los anfibios que se encuentran a mayor altitud tienen una menor probabilidad de ser infectados que los que se encuentran en

altitudes medias, como lo evidenciaron estudios realizados en Puerto Rico en el bosque enano (850 m.s.n.m) y bosque Palo Colorado (661 m.s.n.m.).

La temperatura ha sido reportada como factor clave para el crecimiento y desarrollo de *B. dendrobatidis*. Estudios *in-vitro* han determinado que el patógeno puede crecer en rangos de temperatura que van desde los 10 °C a 27 °C (Piotrowski *et al.* 2004, Berger *et al.* 2004, Woodhams *et al.* 2008). Los anfibios que dieron resultados positivos en el presente estudio se encontraron entre estos rangos de temperaturas (14 °C, 23.5 °C y 25 °C), pero el análisis estadístico no evidencia una relación entre este factor y la concentración de zoosporas. Dentro de las posibles causas de que no exista una relación entre la presencia del patógeno y la concentración de zoosporas con la temperatura, puede estar el que en los años del muestreo (2009-2010) se presentaron variaciones climáticas en el país.

Reportes del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia (IDEAM) informaron que se evidenció el fenómeno de El Niño en 2009, que ocasionó grandes sequías en la zona Andina, así como el fenómeno de La Niña en el 2010, que desencadenó inundaciones como consecuencia del aumento de las precipitaciones, ambos coincidentes con la temporada de muestreo. Estos factores pudieron afectar las condiciones propicias de proliferación de *B. dendrobatidis*, lo cual discrepa con lo descrito por Pounds *et al.* (2006) quienes relacionan el fenómeno de El Niño con el incremento de enfermedades infecciosas y proponen una hipótesis en el que el aumento de la nubosidad favorece el crecimiento del hongo, su supervivencia y reproducción. En los resultados obtenidos durante el año 2009, sólo la especie *Leptodactylus colombiensis* fue positiva a la presencia del patógeno, aunque su carga fúngica fue la más alta (75 zoosporas· μL^{-1}) en comparación con los otros individuos muestreados en el 2010. Estos datos se pueden relacionar con Longo *et al.* (2010), quienes

TABLA 1. Variables ambientales correspondientes a los departamentos y municipios colombianos determinados para el muestreo.

TABLE 1. Environmental variables corresponding to the particular Colombian departments and municipalities for sampling.

Departamento	Municipio	Altitud (m)	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)	N° individuos muestreados/ Bd positivos
Cundinamarca	San Antonio del Tequendama	1150	21	62	59/0
	Madrid	2592	14	71	9/1
Boyacá	Duitama	3559	19	81	2/0
	Santa María	850	24	80	95/2
Caldas	La Dorada	490	24	78	27/0
	Samaná	1550	21	73	9/0
Caquetá	Solita	250	28	92	10/0
	Morelia	258	28	92	4/0
	Valparaiso	210	28	92	9/0
Santander	Encino	2707	12.5	96	5/0
Casanare	Chameza	1100	20	89.5	31/0
	Maní	200	26	80	76/0

TABLA 2. Especies encontradas en los 12 municipios seleccionados para el muestreo.**TABLE 2.** Species found in the 12 municipalities selected for sampling.

Región Geográfica	Departamento	Municipio	Especies	Total	Bd. Positivo			
Andina Central	Caldas	Samaná	<i>Centrolene prosoblepon</i>	1	0			
			<i>Dendropsophus bogerti</i>	1	0			
			<i>Pristimantis taeniatus</i>	4	0			
			<i>Rhinella</i> grupo <i>margaritifera</i>	1	0			
			<i>Smilisca phaeota</i>	2	0			
			La Dorada	<i>Allobates niputidea</i>	1	0		
				<i>Dendropsophus microcephalus</i>	2	0		
				<i>Craugastor raniformis</i>	1	0		
				<i>Engystomops pustulosus</i>	2	0		
				<i>Hypsiboas pugnax</i>	2	0		
		<i>Hypsiboas crepitans</i>		3	0			
		<i>Hyalinobatrachium fleischmanni</i>		2	0			
		<i>Leptodactylus fuscus</i>		1	0			
		<i>Leptodactylus insularum</i>		1	0			
		<i>Pristimantis gaigei</i>		4	0			
		<i>Relictivomer pearsei</i>	3	0				
		<i>Rhinella humboldti</i>	2	0				
		<i>Scinax rostratus</i>	2	0				
		<i>Scinax ruber</i>	1	0				
		Andina Oriental	Santander	Encino	<i>Atelopus mittermeieri</i>	2	0	
<i>Pristimantis miyatai</i>	2				0			
<i>Pristimantis carlossanchezi</i>	1				0			
Cundinamarca	Madrid		San Antonio del Tequendama	<i>Dendropsophus labialis</i>	9	1		
				<i>Dendropsophus padreluna</i>	34	0		
				<i>Pristimantis renjiforum</i>	8	0		
				<i>Pristimantis susaguae</i>	10	0		
				<i>Pristimantis</i> sp.	1	0		
				<i>Rheobates palmatus</i>	6	0		
Boyacá	Duitama		Santa María	<i>Pristimantis elegans</i>	2	0		
				<i>Bolitoglossa altamazonica</i>	5	0		
	Morelia		<i>Dendropsophus mathiassoni</i>	4	1			
			<i>Dendropsophus minutus</i>	2	0			
			<i>Hypsiboas crepitans</i>	6	0			
			<i>Hypsiboas lanciformis</i>	9	0			
			<i>Hypsiboas punctatus</i>	9	0			
			<i>Leptodactylus colombiensis</i>	17	1			
Amazónica			<i>Pristimantis frater</i>	1	0			
			<i>Pristimantis medemi</i>	14	0			
			<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	1	0			
			<i>Rheobates palmatus</i>	5	0			
			<i>Rhinella marina</i>	11	0			
			<i>Rhinella</i> grupo <i>margaritifera</i>	9	0			
			<i>Rulyrana flavopunctata</i>	1	0			
			<i>Siphonops annulatus</i>	1	0			
			<i>Dendropsophus minutus</i>	2	0			
			<i>Pristimantis lanthanites</i>	1	0			
			<i>Scinax garbei</i>	1	0			
			Caquetá	Solita	Valparaíso	<i>Dendropsophus mathiassoni</i>	1	0
						<i>Dendropsophus minutus</i>	1	0

TABLA 2 (Cont). Especies encontradas en los 12 municipios seleccionados para el muestreo.**TABLE 2 (Cont).** Species found in the 12 municipalities selected for sampling.

Región Geográfica	Departamento	Municipio	Especies	Total	Bd. Positivo
Orinoquia	Casanare	Chameza	<i>Hypsiboas punctatus</i>	1	0
			<i>Leptodactylus hylaedactylus</i>	2	0
			<i>Lithobates palmipes</i>	2	0
			<i>Pristimantis altamazonicus</i>	2	0
			<i>Scinax garbei</i>	1	0
			<i>Dendropsophus minutus</i>	1	0
			<i>Hypsiboas punctatus</i>	1	0
			<i>Leptodactylus mystaceus</i>	1	0
			<i>Lithobates palmipes</i>	3	0
			<i>Rhinella marina</i>	1	0
			<i>Rhinella proboscidea</i>	1	0
			<i>Scinax garbei</i>	1	0
		Maní	<i>Hyloscirtus bogotensis</i>	1	0
			<i>Hyalinobatrachium munozorum</i>	4	0
			<i>Leptodactylus colombiensis</i>	13	0
			<i>Pristimantis medemi</i>	10	0
			<i>Pristimantis savagei</i>	2	0
			<i>Pristimantis sp.</i>	1	0
			<i>Dendropsophus mathiassoni</i>	7	0
			<i>Elachistocleis ovalis</i>	2	0
			<i>Hypsiboas crepitans</i>	9	0
			<i>Leptodactylus bolivianus</i>	2	0
			<i>Leptodactylus fragilis</i>	3	0
			<i>Leptodactylus macrosternum</i>	41	0
			<i>Physalaemus fischeri</i>	1	0
			<i>Rhinella marina</i>	2	0
<i>Scinax rostratus</i>	1	0			
<i>Scinax ruber</i>	3	0			
<i>Scinax wandae</i>	5	0			

argumentan que durante la estación seca los niveles de infección pueden aumentar, mientras que en la estación de lluvias se aumenta la prevalencia.

Aunque no existe una relación directa entre la humedad y la presencia de *B. dendrobatidis*, se observa que los valores correspondientes al porcentaje de humedad fueron altos y no presentaron grandes variaciones entre las localidades positivas. Los resultados obtenidos en esta investigación discrepan con los de Woodhams y Alford (2005), quienes reportan que el patógeno puede soportar temperaturas y precipitaciones limitadas pero altas condiciones de humedad. Drew *et al.* (2006) sugieren que los anfibios expuestos a humedad desarrollan más fácilmente la quitridiomycosis que aquellos expuestos a lluvias continuas. Lips *et al.* (2008) sugieren que la combinación de variables ambientales, incluyendo la humedad, influye en el crecimiento y ecología de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Las localidades positivas se encuentran ubicadas en municipios de Boyacá y Cundinamarca; estos departamentos han sido reportados anteriormente en estudios de detección de *B. dendrobatidis* en el país (Ruiz y Rueda-Almonacid 2008; Quintero 2008) lo cual evidencia una posible susceptibilidad de los anfibios de esta región a la presencia del patógeno. Adicionalmente, la región andina presenta una mayor diversidad de especies, por lo cual los anfibios de estas zonas pueden ser más vulnerables (Ron 2005). Este es el primer estudio de detección y cuantificación de *B. dendrobatidis* mediante el uso de PCR en tiempo real (qPCR) en Colombia. Para comprender y determinar un patrón de distribución del patógeno en el país, es necesario realizar estudios en otras zonas como la Cordillera Central ya que los anfibios de esta región no han sido reportados como positivos a la presencia del patógeno. También es necesario realizar estudios de incidencia y prevalencia que permitan determinar el estado poblacional de los anfibios de las localidades reportadas como positivas.

TABLA 3. Concentración de zoosporas de los individuos positivos a la presencia de *B. dendrobatidis* mediante la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) en las localidades colombianas positivas a la presencia de *B. dendrobatidis*.

TABLE 3. Concentration of zoospores of individuals positive for the presence of *B. dendrobatidis* through the technique of real-time PCR (qPCR) in the Colombian locations positive to the presence of *B. dendrobatidis*.

Departamento	Municipio	Localidad	Coordenadas (Norte - Oeste)	Especie	Concentración (Zoosporas·µL ⁻¹)
Boyacá	Santa María	Quebrada Las Vueltas	4° 51' 30.5" N 73° 15' 56.8" W	<i>Leptodactylus colombiensis</i>	75
		Río Bata	4° 50' 53.7" N 73° 16' 20.7" W	<i>Dendropsophus mathiassoni</i>	32
Cundinamarca	Madrid	Finca Altagracia	4° 47' 50.5" N 74° 15' 57.1" W	<i>Dendropsophus labialis</i>	47

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias y la Pontificia Universidad Javeriana por la financiación del presente trabajo. A los laboratorios UNIDIA, Inmunología y Virología de la Pontificia Universidad Javeriana, por el préstamo de sus instalaciones para el análisis de muestras. A M.Sc. Andrés Rymel Acosta por su asesoría conceptual y en la guía de obtención de las muestras.

REFERENCIAS

- Acosta-Galvis, A.R. 2000.** Ranas, salamandras y caeciliias (Tetrapoda: Amphibia) de Colombia. *Biota Colombiana* 1(3):289-319.
- Beard, K.H. y E.M. O'Neill. 2005.** Infection of an invasive frog *Eleutherodactylus coqui* by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hawaii. *Biological Conservation* 126:591-595.
- Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D.E. Green, A.A. Cunningham, C.L. Goggin, R. Slocombe, M.A. Ragan, A.D. Hyatt, K.R. McDonald, H.B. Hines, K.R. Lips, G. Marantelli y H. Parkes. 1998.** Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Science* 95:9031-9036.
- Berger L., R. Speare y A. Kent. 1999.** Diagnosis of chytridiomycosis of amphibians by histological examination. *Zoos Print Journal* 15:184-190.
- Berger, L., R. Speare, H. Hines, G. Marantelli, A.D. Hyatt, K.R. McDonald, L.F. Skerratt, V. Olsen, J.M. Clarke, G. Gillespie, M. Mahony, N. Sheppard, C. Williams y M. Tyler. 2004.** Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal* 82:31-36
- Berger, L., A.D. Hyatt, R. Speare y J.E. Longcore. 2005a.** Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 68:51-63.
- Berger, L., G. Marantelli, L.F. Skerratt y R. Speare. 2005b.** Virulence of the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms* 68:47-50.
- Bonaccorso, E., J.M. Guayasamin, D. Mendez y R. Speare. 2003.** Chytridiomycosis as a possible cause of population declines in *Atelopus cruciger* (Anura: Bufonidae). *Herpetological Review* 4(34):331-334.
- Boyle, D.G., D.B. Boyle, V. Olsen, J.A.T. Morgan y A.D. Hyatt. 2004.** Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real - time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms* 60:141-148.
- Briggs, C.J., R.A. Knapp y V.T. Vredenburg. 2010.** Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 21(107):9695-9700.
- Brucker, R.M., C.M. Baylor, R.L. Walters, A. Lauer, R.N. Harris y K.P.C. Minbiole. 2008a.** The identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology* 34:39-43.
- Brucker, R.M., R.N. Harris, C.R. Schwantes, T.N. Gallaher, D.C. Flaherty, B.A. Lam y K.P.C. Minbiole. 2008b.** Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *Journal of Chemical Ecology* 34:1422-1429.
- Conlon, J.M., S. Iwuamuro y J.D. King. 2009.** Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology* 1163:75-82.
- Drew, A., E.J. Allen y L.J. Allen. 2006.** Analysis of climatic and geographic factors affecting the presence of chytridiomycosis in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* 3(68):245-250.
- Fisher, M.C. y T.W.J. Garner. 2007.** The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal*

- Biology Reviews 21:2-9.
- Garmyn, A., P.V. Rooij, F. Pasmans, T. Hellebuyck, W.V.D. Broeck, F. Haesebrouck y A. Martel. 2012.** Waterfowl: potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. Public Library of Science (PLoS ONE) 7(4):e35038. doi:10.1371/journal.pone.0035038.
- Ghirardi, R., J.A. Lopez, P.A. Scarabotti, M.M. Steciow y M.G. Perotti. 2011.** First record of the chytrid fungus in *Lithobates catesbeianus* from Argentina: exotic species and conservation. Revista Mexicana de Biodiversidad 82:1337-1339.
- Hanselmann, R., A. Rodríguez, M. Lampo, L. Fajardo-Ramos, A. Aguirre, M. Kilpatrick, J.P. Rodríguez y P. Daszak. 2004.** Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. Biological Conservation 120:115-119.
- Harris, R.N., R.M. Brucker, J.B. Walke, M.H. Brecker, C.R. Schwantes, D.C. Flaherty, B.A. Lam, D.C. Woodhams, C.J. Briggs, V.T. Vredenburg y K.P.C. Minbiole. 2009.** Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. The ISME Journal 3:818-824.
- Hyatt, A.D., D.G. Boyle, L. Berger, D. Obendorff, A. Dalton, K. Kriger, J.M. Hero, H. Hines, R. Phillott, R. Campbell, G. Marantelli, F. Gleason y A. Colling. 2007.** Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of Aquatic organisms 73:175-192.
- Kinney, V.C., J.L. Heemeyer, A.P. Pessier y M.J. Lannoo. 2011.** Seasonal pattern of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection and mortality in *Lithobates areolatus*: affirmation of Vredenburg's "10,000 Zoospore Rule". Public Library of Science (PLoS ONE) 6(3): e16708. doi:10.1371/journal.pone.0016708.
- Kruger, K.M., F. Pereoglou y J-M Hero. 2007.** Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in Eastern Australia. Conservation Biology 5(21):1280-1290.
- Lips, K.R., J. Diffendorfer, J. Mendelson Jr. III y M.W. Sears. 2008.** Riding the wave: reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. Public Library of Science Biology (PLoS Biol) 6(3):e72. doi:10.1371/journal.pbio.0060072.
- Longcore, J.E., A.P. Pessier y D.K. Nichols. 1999.** *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov. a chytrid pathogenic to amphibians. Mycologia 91:219-227.
- Longo, A.V., P.A. Burrowes y R.L. Joglar. 2010.** Seasonality of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in direct-developing frogs suggests a mechanism for persistence. Diseases of Aquatic Organisms 92:253-260.
- Longo, A.V. y P.A. Burrowes. 2010.** Persistence with chytridiomycosis does not assure survival of direct-developing frogs. Ecohealth 7(2):185-195.
- Nichols, D.K., E.W. Lamirande, A.P. Pessier y J.E. Longcore. 2001.** Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. Journal of Wildlife Diseases 1(37):1-11.
- Piotrowski, J.S., S.L. Annis y J.F. Longcore. 2004.** Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. Mycologia 1(96):9-15.
- Pounds, A.J., M.R. Bustamante, L.A. Coloma, J.A. Consuegra, M.P.L. Fogden, P.N. Foster, E. La Marca, K.L. Masters, A. Merino-Viteri, R. Puschendorf, S.R. Ron, G.A. Sanchez-Azofeifa, C.J. Still y B.E. Young. 2006.** Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. Nature 439:161-167.
- Puschendorf, R., A.C. Carnaval, J. VanDerWal, H. Zumbado-Ulate, G. Chaves, F. Bolaños y R.A. Alford. 2009.** Distribution models for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Costa Rica: proposing climatic refuges as a conservation tool. Diversity and Distributions 15:401-408.
- Quintero, M.P. 2008.** Estimating infection level and vulnerability of Andean frogs to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. Tesis de Maestría. Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia.
- Rachowicz, L.J., J.M. Hero, R.A. Alford, J.W. Taylor, J.A.T. Morgan, V.T. Vredenburg, J.P. Collins y C.J. Briggs. 2005.** The novel and endemic pathogen hypothesis: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. Conservation Biology 5(19):1441-1448.
- Rollins-Smith, L.A. y J.M. Conlon. 2005.** Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. Developmental and Comparative Immunology 7(29):589-598.
- Ron, S.R., W.E. Duellman, L.A. Coloma y M.R. Bustamante. 2003.** Population decline of the Jambato Toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. Journal of Herpetology 1(37):116-126.
- Ron, S.R. 2005.** Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. Biotropica 2(37):209-221.
- Rueda-Almonacid, J.V., F. Castro y C. Cortez. 2006.** Técnicas para el inventario y muestreo de anfibios: Una compilación. En: Angulo, A., J.V. Rueda-Almonacid, J.V. Rodríguez-Mahecha y E. La Marca (eds.). Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina. Conservación Internacional. 299 pp.
- Ruiz, A. y J.V. Rueda-Almonacid. 2008.** *Batrachochytrium dendrobatidis* and chytridiomycosis in anuran amphibians of Colombia. Ecohealth 5:27-33.
- Sánchez, D., A. Chacon-Ortiz, F. Leon, B.A. Han y M. Lampo. 2008.** Widespread occurrence of an emerging pathogen in amphibian communities of the Venezuelan Andes. Biological Conservation 141:2898-2905.
- Seimon, T.A., A. Seimon, P. Daszak, S.R.P. Halloy, L.M. Schloegel, C.A. Aguilar, P. Sowell, A.D. Hyatt, B. Konecky y J.E. Simmons. 2007.** Upward range extension of Andean anurans and chytridiomycosis to extreme elevations in response to tropical deglaciation. Global Change Biology 13:288-299.
- Solis, R., G. Lobos, S. Walker, M. Fisher y J. Bosch. 2010.** Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in feral populations of *Xenopus laevis* in Chile. Biology Invasions 12:1641-1646.
- Swei, A., J.J.L. Rowley, D. Rodder, L.L. Diermos, A.C. Diermos,**

- C.J. Briggs, R. Brown, T.T. Cao, T.L. Cheng, R.A. Chong, B. Han, J-M. Hero, H.D. Hoang, M.D. Kruskini, D.T. Thuy Le, J.A. McGuire, M. Meegaskumbura, M. Min, D.G. Mulcahy, T. Neang, S. Phimmachak, D. Rao, N.M. Reeder, S.D. Schoville, N. Sivongxay, N. Srei, M. Stock, B.L. Stuart, L.S. Torres, D.T.A. Tran, T.S. Tunstal, D. Vieites y V.T. Vredenburg. 2011.** Is chytridiomycosis an emerging infectious disease in Asia? Public Library of Science (PLoS ONE) 6(8):e23179. doi:10.1371/journal.pone.0023179.
- Velásquez, B.E., F. Castro, G.W. Bolívar y M.I. Herrera. 2008.** Infección por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros de la Cordillera Occidental de Colombia. *Herpetotropicos* 4(2):65-70.
- Voyles, J., E.B. Roseblum y L. Berger. 2011.** Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Elsevier Masson SAS* 13:25-32.
- Vredenburg, V. y C. Briggs. 2004-2007.** Information on amphibian biology and conservation. Berkeley, California. http://amphibiaweb.org/chytrid/swab_instruction.pdf (18 septiembre 2010).
- Vredenburg, V.T., R.A. Kannap, T.S. Tustall y C.J. Briggs. 2010.** Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 21(107):9689-9494.
- Wake, D.V. y V.T. Vredenburg. 2008.** Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:11466-11473. doi10.1073/pnas.0801921105.
- Woodhams, D.C. y R.A. Alford. 2005.** Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biology* 5(19):1449-1459.
- Woodhams, D.C., V.L. Kilburn, L.K. Reinert, J. Voyles, D. Medina, R. Ibañez, A.D. Hyatt, D.G. Boyle, J.D. Pask, D.M. Green y L.A. Rollins-Smith. 2008.** Chytridiomycosis and amphibian population declines continue to spread eastward in Panama. *EcoHealth* 5:268-274.