

DETECCIÓN DE *Batrachochytrium dendrobatidis* EN EL ENSAMBLAJE DE ANFIBIOS EN LA REGIÓN ANDINA CENTRAL, ORIENTAL, ORINOQUIA Y AMAZONIA DE COLOMBIA Y EL ESTUDIO *IN-VITRO* DE LA ACCION ANTAGONICA DE LA BACTERIA *Janthinobacterium lividum* FRENTE A LA CEPA COLOMBIANA DE *Batrachochytrium dendrobatidis*.



LEIDER ALEXANDRA VASQUEZ OCHOA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar el título de Magister en Ciencias Biológicas.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIA

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

BOGOTA D.C. 2011

DETECCIÓN DE *Batrachochytrium dendrobatidis* EN EL ENSAMBLAJE DE ANFIBIOS EN LA REGIÓN ANDINA CENTRAL, ORINOQUIA Y AMAZONIA DE COLOMBIA Y EL ESTUDIO *IN-VITRO* DE LA ACCION ANTAGONICA DE LA BACTERIA *Janthinobacterium lividum* FRENTE A LA CEPA COLOMBIANA DE *Batrachochytrium dendrobatidis*.



LEIDER ALEXANDRA VASQUEZ OCHOA

APROBADO

Marcela Franco Correa Dra.

Director

Vance Vredenburg Dr.

Jurado

Firma manuscrita en tinta negra que dice 'José Nicolás Urbina Cardona'.

Nicolás Urbina Cardona Dr.

Jurado

Firma manuscrita en tinta negra que dice 'Hernando Valencia Zapata'.

Hernando Valencia Zapata Dr.

Jurado

DETECCIÓN DE *Batrachochytrium dendrobatidis* EN EL ENSAMBLAJE DE ANFIBIOS EN LA REGIÓN ANDINA CENTRAL, ORIENTAL, ORINOQUIA Y AMAZONIA DE COLOMBIA Y EL ESTUDIO *IN-VITRO* DE LA ACCION ANTAGONICA DE LA BACTERIA *Janthinobacterium lividum* FRENTE A LA CEPA COLOMBIANA DE *Batrachochytrium dendrobatidis*



LEIDER ALEXANDRA VASQUEZ OCHOA

APROBADO

Ingrid Schuler Ph.D

Decana Académica

Manuel A. Franco C. Ph.D

Director de postgrado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no publique nada contrario al dogma y a la moral Católica y porque la tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Dedicatoria

*A mi madre, padre, hermanos y en especial a mis sobrinos Jorge
Andrés y David Santiago que siempre iluminan mi vida con una
sonrisa.*

AGRADECIMIENTOS

Doctora Marcela Franco Correa, directora y orientadora de este proyecto, por permitirme hacer parte de este estudio, por su paciencia, formación y colaboración.

Msc. Andrés Rymel Acosta por su asesoría conceptual y por contagiarme su pasión por los anfibios.

C.D. Msc. Daniel Prada por su colaboración en la parte experimental y por compartir su conocimiento conmigo.

Doctora María Ximena Rodríguez por sus aportes y constante preocupación.

Doctora Claudia Cuervo por su colaboración y aportes en Biología molecular.

Laboratorio UNIDIA, por el préstamo de sus instalaciones

Laboratorio de Virología por préstamo de sus equipos

Laboratorio de Inmunología por préstamo de la PCR en tiempo real.

Laboratorio de Micología de la Universidad de los Andes por la donación de la cepa de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Departamento de Biología de San Francisco State University por la donación de la bacteria *Janthinobacterium lividum*

Mis compañeros de laboratorio y sobre todo a Iván Camilo Cortes por su amistad, colaboración y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Pilar Bahamon Carmona, Mayra Cardozo y Alejandra Ramírez Castro por nutrir este proyecto con su conocimiento, amistad y colaboración.

Mi Padre y hermanos Yaneth, Fabio y Julio Mario por su apoyo incondicional y por impulsarme en este reto académico.

Mis compañeros de estudio Carolina Mejía, Linda Gómez, Guillermo Buraglia, Claudia Méndez, Shirley Rojas, Carel Carvajal y Marcela Ramos por su compañía, amistad, apoyo y por hacer este camino más fácil.

Mi mejor amiga Alexandra Fernández por su valioso y permanente apoyo.

Negro, Sabrina, Lía y Sasha por su compañía durante las largas noches de estudio.

Pontificia Universidad Javeriana por su formación y en especial a quienes fueron mis docentes por su aporte y por reafirmar mi amor por la ciencia.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron al buen término de este trabajo, a todos gracias totales

INDICE GENERAL

	Paginas
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCION	3
1.1. Justificación.	4
1.2. Objetivos.	7
1.2.1. Objetivo general.	7
1.2.2. Objetivos específicos.	7
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.	8
2.1. Declive de anfibios.	8
2.2. La quitridionicosis y el hongo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>.	10
2.3. Técnicas de detección de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>.	12
2.3.1. Análisis histológico.	12
2.3.2. PCR.	13
2.3.3. PCR en Tiempo Real.	13
2.3.4. Región ITS.	14
2.3.5. Análisis de datos.	15
2.4. Distribución de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>.	17
2.4.1. Norteamérica.	18
2.4.2. Centroamérica.	19
2.4.3. Suramérica.	21
2.4.4. <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> en Colombia.	22

2.5.	Mecanismos de defensa de los anfibios frente a <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>.	23
2.5.1.	Características de <i>Janthinobacterium lividum</i> .	25
3.	METODOLOGIA.	26
3.1.	Zona de estudio.	26
3.2.	Recolección de las muestras.	26
3.3.	Análisis por PCR en Tiempo Real.	28
3.3.1.	Extracción de ADN.	28
3.3.2.	Optimización de las condiciones de amplificación de la PCR en Tiempo Real.	28
3.3.3.	Amplificación de la secuencia de ADNr perteneciente a la región ITS- 1 y la sub unidad 5.8s por PCR en Tiempo Real.	28
3.3.4.	Cuantificación de las muestras.	29
3.4.	Referenciación geográfica de la distribución de la enfermedad en las zonas determinadas para el muestreo de los anfibios.	29
3.5.	Estudio de la fisiología de <i>Janthinobacterium lividum</i> para determinar el mecanismo de antagonismo frente a <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>.	30
3.5.1.	Curva de crecimiento de la bacteria <i>Janthinobacterium lividum</i> .	31
3.5.2.	Ensayo inhibitorio.	31
4.	RESULTADOS	32
4.1.	Optimización de la PCR en Tiempo Real	32
4.2.	Curva de calibración.	33
4.3.	Control de extracción de ADN.	34
4.4.	Resultados de PCR en Tiempo Real.	35

4.4.1. Especies encontradas.	35
4.4.2. Especies diagnosticadas como positivas al patógeno.	36
4.4.3. Cuantificación de zoosporas.	36
4.4.4. Variables Ambientales asociadas a <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .	37
4.5. Distribución de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>.	40
4.5.1. Características de Santa María (Boyacá).	40
4.5.2. Características de Madrid (Cundinamarca).	42
4.6. Ensayo inhibitorio.	44
4.6.1. Curva de crecimiento de <i>Janthinobacterium lividum</i>	44
4.6.2. Antagonismo de <i>Janthinobacterium lividum</i>	45
5. DISCUSIÓN.	46
6. CONCLUSIONES.	56
7. RECOMENDACIONES.	57
8. BIBLIOGRAFIA.	58
9. ANEXOS.	80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de amplificación de la PCR en Tiempo real

32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esporangios y zoosporas del <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .	10
Figura 2. Representación gráfica del ADN ribosomal (ADNr) mostrando el espacio interno transcrito 1 (ITS1) y la subunidad 5.8S, con la ubicación de los primers utilizados para la amplificación.	15
Figura 3. Curva de amplificación de la PCR en tiempo real.	14
Figura 4. Distribución mundial del hongo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> .	18
Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Janthinobacterium lividum</i> .	25
Figura 6. Toma de muestras de la población anfibia por el método del hisopo.	27
Figura 7. Curva de calibración de la PCR en tiempo real.	33
Figura 8. Porcentaje de familias de anfibios registrados durante el muestreo en los 12 municipios de la región Andina Central, Oriental, Amazonia y Orinoquia.	35
Figura 9. Concentración de zoosporas· μL^{-1} de las muestras positivas.	36
Figura 10. Relación de la concentración de zoosporas· μL^{-1} y Altitud.	38
Figura 11. Relación de la concentración de zoosporas· μL^{-1} y Temperatura.	39
Figura 12. Relación de la concentración de zoosporas· μL^{-1} y Humedad.	40
Figura 13. Localización del Municipio de Santa María (Boyacá).	41
Figura 143. Localización del Municipio de Madrid (Cundinamarca).	42
Figura 15. Mapa de distribución de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	43
Figura 16. Curva de crecimiento de <i>Janthinobacterium lividum</i>	43
Figura 17. Evaluación del antagonismo de <i>Janthinobacterium lividum</i> sobre el crecimiento de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> por difusión de metabolito en pozo	44

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Altitud, Temperatura y Humedad relativa de los Municipios de muestreo	80
Anexo 2. Especies encontradas en los 12 municipios seleccionados para el muestreo.	81
Anexo 3. Análisis estadístico de la curva de calibración.	85
Anexo 4. Promedio y desviación estándar de las diluciones utilizadas para la curva de calibración.	85
Anexo 5. Curva de amplificación de la cepa Ev001.	86
Anexo 6. Análisis estadístico regresión logística binaria de las variables ambientales.	86
Anexo 7. Análisis estadístico Regresión lineal simple de las variables ambientales (Altitud).	87
Anexo 8. Análisis estadístico Regresión lineal simple de las variables ambientales (Temperatura).	87
Anexo 9. Análisis estadístico Regresión lineal simple de las variables ambientales (Humedad).	87
Anexo 10. Resultados de la curva de crecimiento de <i>Jarthinobacterium lividum</i>	88
Anexo 11. Tabla de resultados de la prueba de antagonismo por difusión de metabolito en pozo	89
Anexo 12. Medios de cultivo utilizados.	89

RESUMEN

El presente proyecto se realizó con el fin de detectar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en poblaciones de anfibios pertenecientes a 13 localidades de la región Andina Central, Oriental, Orinoquia y Amazonia de Colombia. La toma de muestras se realizó entre los años 2009-2010 al inicio de la temporada de lluvias, observando a los anfibios mediante el método de relevo por encuentros visuales y realizando muestreos por la técnica del hisopo. El análisis y procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con sonda Taqman, amplificando una secuencia localizada entre la región ITS1 y la sub unidad 5.8s ribosomal. Se analizaron 12 familias del orden Anura (330 individuos), Apoda (1 individuo) y Caudata (5 individuos) representadas en 56 especies. De 336 individuos muestreados 3 fueron diagnosticados como positivos a la presencia de *B. dendrobatidis* con bajas concentraciones de zoosporas; estos anfibios corresponden a las especies *Leptodactylus colombiensis*, *Dendropsophus labialis* y *Dendropsophus mathiassoni*; los cuales fueron muestreados en los municipios de Santa María (Boyacá) y Madrid (Cundinamarca), en la Cordillera Oriental de Colombia. Los análisis estadísticos realizados no evidenciaron relación entre las variables ambientales tomadas durante los muestreos (altitud, temperatura y humedad relativa) y la presencia del patógeno. Se realizó, en forma paralela, el estudio de la capacidad antifúngica de la bacteria *Janthinobacterium lividum*, donada por el Departamento de Biología de San Francisco State University, frente a la cepa EV001 del hongo *B. dendrobatidis* aislado de anfibios colombianos, donada por el laboratorio de Micología de la Universidad de los Andes (Bogotá). Para este estudio se realizó la curva de crecimiento de la bacteria y se observó el comportamiento del hongo, frente a la misma a nivel *in-vitro*, mediante la prueba de difusión de metabolito en pozo, presentando un mayor halo de inhibición en la hora 52, concluyendo que *J. lividum* es antagonista de *B. dendrobatidis* bajo condiciones de crecimiento óptimas para los dos microorganismos.

ABSTRACT

This project was conducted to detect the presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations from 13 localities in the Central Andean region, eastern Orinoco, and Amazon of Colombia. The sampling was conducted between the years 2009-2010 at the beginning of the rainy season, observing the amphibians by using the relay method of visual encounters (REV) and, subsequently, sampling them by the swab technique. The analysis and processing of samples was performed in the laboratory of the Agricultural Research Unit at the Pontificia Universidad Javeriana, by using real-time PCR with Taqman probe and amplifying a sequence located between the region ITS1 and 5.8s ribosomal subunit. We analyzed 12 families from the order Anura (330), Apoda (1) and Caudata (5), represented by 56 species. Of 336 individuals sampled, 3 were diagnosed as positive for the presence of *B. dendrobatidis* with low concentrations of zoospores. These amphibians are the species *Leptodactylus colombiensis*, *Dendropsophus labialis*, and *Dendropsophus mathiassoni*, which were sampled in the municipalities of Santa María (Boyacá) and Madrid (Cundinamarca) in the Eastern range of Colombia. The statistical analysis did not show any relationship between the variables taken during the sampling (altitude, temperature, and relative humidity) and the presence of the pathogen. In parallel, we performed the study of the antifungal ability of the bacteria *Janthinobacterium lividum* donated by the Department of Biology at San Francisco State University in the presence of the EV001 strain of the fungus *B. dendrobatidis*, isolated from Colombian amphibians. This fungus was donated by the Mycology Laboratory of the Universidad de los Andes (Bogotá). For this study, we performed the curve of growth of bacteria and we observed the behavior of the fungi compared to the same level in vitro, by the testing of the metabolite diffusion in wells. This showed a greater zone of inhibition in hour 52, from which we can conclude that *J. lividum* is *B. dendrobatidis* antagonist under optimal growth conditions for the two microorganisms.

1. INTRODUCCION

La quitridiomycosis cutánea es una enfermedad infecciosa implicada en el declive poblacional de anfibios, causada por el hongo patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (*B.d*) (Longcore *et al.*, 1999) el cual afecta las zonas queratinizadas de de los renacuajos (región oral) (Fellers *et al.*, 2001; Marantelli *et al.*, 2004; Rachowicz y Vredenburg 2004) y la epidermis de los adultos (Berger *et al.*, 1998; Daszak *et al.*, 1999).

B. dendrobatidis pertenece al filum Quitridiomycota, donde se encuentran hongos cosmopolitas en hábitats acuáticos y en suelo húmedo, degradadores de celulosa, quitina y queratina (Powell 1993), presentan un ciclo de vida en dos fases: una móvil (ambiente acuático y dispersión de las zoosporas) y otra no móvil (enquistamiento como esporangio en el hospedero). A medida que el renacuajo se va desarrollando, el hongo *B.d* se distribuye y coloniza la dermis de los adultos, ocasionando la muerte (Kilpatrick *et al.*, 2010).

Las regiones donde se ha presentado mayor predominancia de la presencia de *B. dendrobatidis* incluyen diversos hábitats en el mundo, afectando principalmente las zonas donde se encuentra una mayor diversidad de anfibios (Ron 2005), razón por la cual Colombia con 750 especies, de las cuales 31 son del orden apoda, 18 son del orden caudata y 702 son del orden anuro, presenta una alta vulnerabilidad (Acosta-Galvis *Com. Pers* 2010.). Desde hace más de una década existen reportes de muertes masivas en la serranía del Paraguas, en los límites de los Departamentos del Chocó y el Valle del Cauca (Lynch y Grant 1998), amenazas de declive de anfibios en montañas y bosques premontanos del país (Rueda-Almonacid 1999) y una alta disminución poblacional de especies endémicas como *Atelopus minutulus*, *Atelopus muisca*, *Atelopus mittermeieri*, *Atelopus arsyecue* entre otras (AmphibianWeb, 2011). Las investigaciones y publicaciones sobre la quitridiomycosis en Colombia son muy escasas (Ruiz y Rueda-Almonacid 2008; Velásquez *et al.*, 2008; Quintero 2008) donde los diagnósticos actualmente publicados se han realizado mediante análisis histológico, cuya técnica es invasiva y requiere de mucha experiencia por parte del

investigador, dificultando el dictamen de la enfermedad, y por PCR convencional, la cual presenta poca sensibilidad principalmente en la detección de muestras obtenidas de anfibios silvestres, por eso el objetivo de este estudio es detectar el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, utilizando protocolos moleculares como la PCR en tiempo real, que han sido establecidos en diferentes laboratorios en el mundo, debido a que permiten 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). Paralelamente a este análisis, se realizó el estudio *in-vitro* de la evaluación del antagonismo entre la bacteria *Janthinobacterium lividum* y el hongo *B. dendrobatidis* (aislamiento colombiano donado por la Universidad de los Andes), con el fin de determinar el grado de antagonismo que esta bacteria presenta frente al aislamiento colombiano (Brucker *et al.*, 2008a; Brucker *et al.*, 2008b; Laurer *et al.*, 2007; Laurer *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2009; Brecker *et al.*, 2009; Lam *et al.*, 2010).

1.1. JUSTIFICACIÓN

Los anfibios son organismos importantes en la mayoría de ecosistemas debido a su diversa posición en la cadena trófica, ya que los adultos regulan la población de plagas y los renacuajos pueden ser presas de especies con hábitats acuáticos (Blaustein *et al.*, 1994). Desde los años 80's se ha reportado una alarmante disminución en las poblaciones a nivel mundial, no solo en zonas que han sido intervenidas por el hombre sino en lugares prístinos y áreas destinadas para la conservación, razón por la cual, la comunidad científica ha desarrollado estrategias como programas de monitoreo, modelos estadísticos e investigaciones experimentales que permitan establecer el origen de este declive (Young *et al.*, 2001; Lips 1998; Lips 1999; Lips *et al.*, 2005; La Marca *et al.*, 2005). Una de las conclusiones más relevantes es la acción sinérgica de factores abióticos y bióticos, tales como: la fragmentación de su hábitat para la explotación minera, ganadera, usos agropecuarios y cultivos ilícitos, la introducción de especies exóticas, el comercio ilegal, así como factores ambientales, principalmente la radiación ultravioleta, el cambio climático y la aparición de enfermedades emergentes como la quitridiomycosis (Young *et al.*, 2001; Lips *et al.*, 2005; Acosta-Galvis *et al.*, 2006; Becker y Zamudio 2011).

La quitridiomycosis es una epidemia reconocida como una enfermedad de declaración obligatoria (Organización Mundial de Sanidad Animal 2011), la cual es el resultado de una infección cutánea producida por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Longcore *et al.*, 1999). Este patógeno se caracteriza por ser generalista, debido a que afecta diversas clases 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 de un amplio margen de tolerancia en condiciones medio ambientales (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). En Colombia la presencia del hongo ya ha sido documentada en

algunas zonas de país (Ruiz y Rueda-Almonacid 2008; Velásquez *et al.*, 2008; Quintero 2008), pero estos estudios no han sido suficientes para determinar el rango de distribución del patógeno, a pesar que el país ocupa el segundo lugar a nivel mundial en cuanto a diversidad de anfibios (IUCN Red List 2011) con un alto porcentaje de endemismo poblacional de estas especies (Acosta-Galvis 2000), por esta razón es importante realizar la detección de *B. dendrobatidis* en ensamblajes de anfibios, localizados en otras zonas del país como la Orinoquia y los bosques andinos donde la presencia del patógeno es más probable debido a la diversidad de especies y a las condiciones medio ambientales que favorecen su proliferación, como son: la temperatura, la humedad relativa y la altitud (Ron 2005). Adicionalmente, en aras de una posible solución que disminuya este flagelo ambiental, es necesario estudiar mecanismos que permita mitigar la enfermedad en las poblaciones afectadas, como la interacción *in-vitro* de cepas colombianas con la bacteria *Janthinobacterium lividum*, la cual ha demostrando un potencial antimicótico letal para *Batrachochytrium dendrobatidis* (Harris *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2009; Laurer *et al.*, 2007; Laurer *et al.*, 2008; Brucker *et al.*, 2008a; Brucker *et al.*, 2008b; Brecker *et al.*, 2009; Brecker y Harris 2010; Lam *et al.*, 2010).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Detectar la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* mediante técnicas moleculares en ensamblajes de anfibios de localidades pertenecientes a la región Andina Central, Oriental, Orinoquia y Amazonia de Colombia y estudiar la capacidad antifúngica de la bacteria *Jarthinobacterium lividum* como antagonista del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (cepa colombiana).

1.2.2 Objetivo Especifico

- Determinar la concentración del hongo *B. dendrobatidis* mediante PCR en tiempo real en los ensamblajes de anfibios muestreadas
- Referenciar la distribución geográfica a *B. dendrobatidis* en las zonas determinadas para el muestreo de los anfibios.
- Evaluar la interacción de *J. lividum* y *B. dendrobatidis* a nivel *in-vitro* mediante la técnica de difusión de metabolito en pozo.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. Declive de Anfibios

Desde la década de los años 80's se han registrado los primeros reportes de disminución de especies, demostrando la problemática mundial sobre el declive de anfibios (Alford y Richards *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2001; Lips *et al.*, 2005). El origen de estas desapariciones no se ha terminado de dilucidar debido a las dificultades que se presentan para su estudio, ya que se requiere de intensos trabajos en campo para su monitoreo y control. Hay evidencias de que la disminución de los anfibios se ha presentado tanto en zonas intervenidas por el hombre como en áreas protegidas para la conservación, uno de los casos más documentados han sido las ranas neotropicales de la familia Atelopus cuya condición está en crisis ya que la mayoría de sus especies se encuentran clasificadas según la IUCN 2011 en las categorías de peligro crítico y peligro vulnerable (Pounds y Crump 1994; La Marca *et al.*, 2005; Acosta-Galvis *et al.*, 2006).

A continuación se exponen las causas posibles que permiten explicar la reducción poblacional de los anfibios:

- La influencia de la radiación ultravioleta que puede causar efectos letales en los huevos y en los embriones de los anfibios ocasionando alteraciones en el ADN y muerte celular, también pueden trabajar en conjunto con contaminantes, patógenos o cambios climáticos para afectar negativamente a estas poblaciones (Blaustein *et al.*, 1996; Blaustein y Kiesecker 2002; Middleton *et al.*, 2001).
- Los pesticidas y fertilizantes utilizados en la agricultura, que son arrastrados por las lluvias, contaminan los cuerpos de agua dulce, afectando la mayoría de los anfibios que se desarrollan en estos ambientes. Los más perturbados son los huevos y los estados larvales, ya que los contaminantes interrumpen el desarrollo metamórfico, generando muertes prematuras. Los adultos también son afectados,

porque al tener una piel desnuda y permeable, la penetración y el almacenamiento de estos tóxicos en el organismo, causa malformaciones y alteraciones en el comportamiento (Blaustein y Kiesecker 2002). En Colombia, estudios realizados en la especie *Smilisca phaeota*, demostraron que concentraciones subletales de pesticidas organofosforados afectan el desarrollo larval y reducen el tamaño corporal de los renacuajos (Gallo *et al.*, 2006).

- La destrucción y fragmentación de las zonas habitadas por los anfibios causan una reducción significativa de estas poblaciones ya que, dificultan su dispersión, afectando el modo reproductivo y variabilidad genética de estas especies (Alford y Richards 1999; Blaustein y Kiesecker 2002).
- Las alteraciones en las variables climáticas como la temperatura y la precipitación modifican los ciclos reproductivos de los anfibios, los microhábitats e intensifican la sensibilidad de las especies a patógenos y enfermedades como la quitridiomycosis (Alexander y Eischeid 2001; Carey *et al.*, 2001; Pounds 2001).
- La introducción de especies exóticas ha generado una gran polémica debido a las diversas formas que pueden afectar a los anfibios ya que compiten con las especies nativas por alimento o bien actúan como depredadores de los huevos y de los renacuajos (Blaustein y Kiesecker 2002). Adicionalmente son vectores de enfermedades, como la rana *Xenopus laevis* o el sapo *Rhinella marina* a quienes se les atribuye la distribución del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Weldon *et al.*, 2004; Fisher y Garner 2007).
- Las enfermedades infecciosas emergentes han sido uno de los factores bióticos que más han influenciado en el declive de anfibios. Existen tres patógenos que han recibido mayor interés por parte de la comunidad científica como son *Ranavirus*, el cual se caracteriza por causar epidemias recurrentes en la fase acuática, ocasionando ulceraciones y necrosis en los órganos internos de los

individuos infectados, el hongo oomycete patógeno *Saprolegnia ferax* que contribuye en gran escala a la mortalidad de los embriones (Kiesecker *et al.*, 2001; Blaustein y Kiesecker 2002) y el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* el cual ha hecho que la población de anfibios disminuya en forma generalizada a nivel mundial (Daszak *et al.*, 2003).

2.2. La quitridiomycosis y el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*

La quitridiomycosis es una epidemia fúngica, descrita por primera vez en el año de 1998 por Berger y colaboradores, en un estudio realizado a un grupo de anfibios enfermos y moribundos encontrados en Australia y Panamá entre 1993 y 1998. En las muestras de tejidos de piel examinadas mediante técnicas histológicas se encontraron alteraciones en la epidermis de los adultos, específicamente en el estrato córneo y granuloso, también observaron que en los estados juveniles se presentaban cambios en la región oral. Debido a la ultraestructura uniflagelada de las zoosporas y a la presencia de esporangios esféricos e inoperculados, el hongo se incluyó en el filum Chitridiomycota (Berger *et al.*, 1998; Longcore *et al.*, 1999) (Figura 1).

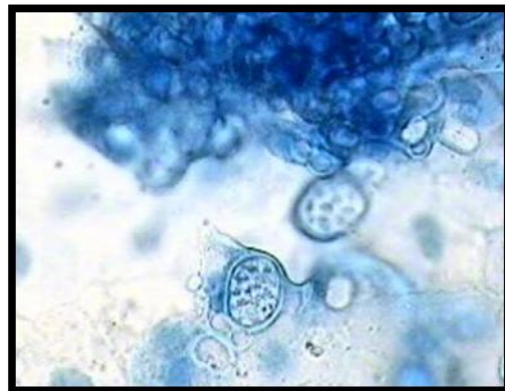


Figura 1. Esporangios y zoosporas del *Batrachochytrium dendrobatidis*. Foto Acosta-Galvis 2009.

Los organismos clasificados dentro del filum Chitridiomycota se encuentran comúnmente en sistemas acuáticos como parásitos de algas y en el suelo degradando polen, quitina y queratina (Letcher *et al.*, 2006). *B. dendrobatidis* es el primer caso

hasta ahora reportado de un hongo quitridio capaz de vivir a espensas de vertebrados y en especial de la clase amphibia (Berger *et al.*, 1998).

El ciclo de vida de *B. dendrobatidis* se da en dos etapas, una acuática, móvil y de dispersión como zoospora y otra sésil de enquistamiento. Cuando la zoospora se aloja en el hospedero el flagelo es reabsorbido para dar paso a la formación de los rizoides y al crecimiento de los talos los cuales maduran de 4 a 5 días; posteriormente las zoosporas que se han formado mediante división mitótica son descargadas de los esporangios cuando las condiciones de temperatura y humedad son apropiadas dando inicio nuevamente al ciclo (Berger *et al.*, 2005a). En condiciones de laboratorio se han realizado investigaciones relacionadas con la fisiología de las zoosporas donde se determinó que para su crecimiento y reproducción *in-vitro*, la temperatura adecuada se encuentra en un rango de 4 a 25°C y el pH entre de 4 y 8 (Piotrowski *et al.*, 2004).

A pesar de los estudios realizados, aún no se sabe el mecanismo de contagio del patógeno, algunas suposiciones permiten deducir que el modo de transmisión se puede dar en forma horizontal directa durante el amplexo y el cuidado parental de los huevos y en forma indirecta mediante vectores como las plumas de las aves, o por contacto con cuerpos de agua y suelos contaminados con el patógeno (Johnson y Speare 2005; Puschendorf *et al.*, 2006a). La sintomatología puede variar entre las especies, al inicio del contagio de la enfermedad se presenta un comportamiento asintomático pero cuando los niveles de infección son altos, los síntomas más característicos a nivel general son anorexia, aletargamiento y posturas anormales, y a nivel cutáneo se observan mudas excesivas y decoloración de la piel, hiperqueratosis, hiperplasia y ulceraciones (Berger *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 2005a; Nichols *et al.*, 2001). En anfibios metamórficos se observan deformaciones y pérdida de partes del disco oral (Fellers *et al.*, 2001; Vredenburg y Summers 2001; Marantelli *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2010). Las causas de muerte en los anfibios aún no se han establecido, razón por la cual se han desarrollado hipótesis que permiten explicar los resultados fatales de la enfermedad para los anfibios. En primer lugar se sugiere que la hiperqueratosis crea una barrera impermeable que altera la hidratación, el balance electrolítico y el intercambio gaseoso (Berger *et al.*, 1998; Voyles *et al.*, 2007).

También se ha propuesto que el patógeno produce enzimas proteolíticas que son tóxicas para el anfibio (Berger *et al.*, 1998; Symonds *et al.*, 2008) de igual forma se ha planteado que la acción sinérgica de estos dos factores es la que ocasiona la muerte (Berger *et al.*, 1998).

2.3. Técnicas de detección del *Batrachochytrium dendrobatidis*

Para la detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* se han utilizado técnicas de microscopía como el análisis histológico (Berger *et al.*, 1999) y molecular, como la PCR convencional (Annis *et al.*, 2004) y PCR en tiempo real (Boyle *et al.*, 2004).

2.3.1 Análisis Histológico

El análisis histológico es una técnica invasiva aconsejable para la detección del patógeno en animales que han sido utilizados para colección (Berger *et al.*, 1999), a pesar de su poca sensibilidad y especificidad ha sido utilizada en la mayoría de los países del mundo, incluyendo Colombia. Esta técnica requiere una mayor experiencia en la identificación de los organismos, ya que puede detectar falsos positivos al confundir las zoosporas del hongo con las células de la epidermis o arrojar falsos negativos, al realizar el análisis al inicio de la enfermedad cuando el nivel de infección es bajo (Berger *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 2004). Se requiere de una muestra de la piel del anfibio conservada en etanol y formaldehído, que posteriormente es embebida en parafina y teñida con hetoxilina y eosina, cuya finalidad es identificar las diferentes etapas de crecimiento de los zoosporangios en el estrato córneo y granuloso (Berger *et al.*, 1999).

2.3.2 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular que permite obtener un gran número de copias a partir de un fragmento específico de ADN. Fue

utilizada para detectar a *Batrachochytrium dendrobatidis* por Annis en el año 2004, para procesar un mayor número de muestras utilizando pequeñas cantidades de tejido. A pesar de los buenos resultados obtenidos, estos no permitían tener una gran sensibilidad ya que solo se pudo amplificar una concentración mínima de 10 zoosporas y adicionalmente determinaron que los oligonucleótidos específicos (primers) diseñados no eran tan específicos ya que pudieron amplificar secuencias de otros quitridios como *Podochytrium dentatum* que aunque no crece en la piel de los anfibios, se encuentra en el medio ambiente, lo cual puede generar falsos positivos.

2.3.3 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real fue utilizada por Boyle y colaboradores en el 2004, debido a la necesidad de obtener resultados que permitieran una detección fiable y temprana en animales silvestres que no presentaban signos visibles de la enfermedad. La fundamentación de la PCR en tiempo real se basa en los principios de la PCR convencional donde el ADN es copiado y amplificado, mediante el uso de enzimas termoestables (Taq polimerasa) y oligonucleótidos específicos (primers), además permite cuantificar la concentración de ADN de una muestra incluso cuando las cantidades de ella son muy pequeña (Valasek y Repa 2005). Adicionalmente es una técnica rápida, no invasiva, con alta sensibilidad (puede detectar desde una zoospora en adelante) y específica (los primers y la sonda son diseñados para la secuencia que se desea amplificar) (Boyle *et al.*, 2004; Kriger *et al.*, 2006; Hyatt *et al.*, 2007).

La PCR en tiempo real utiliza compuestos químicos que permiten monitorizar uno a uno los ciclos de amplificación. Estos componentes pueden ser inespecíficos y específicos. Entre los sistemas de detección inespecíficos el más utilizado es el SYBR Green. Este colorante químico es un agente intercalante que emite la fluorescencia cuando se une al surco menor del ADN de doble cadena. Tiene la ventaja que no requiere un diseño específico, además los costos de uso son muy bajos, pero su inespecificidad requiere el mejoramiento de las condiciones de reacción, un mejor diseño de los primers utilizados y un análisis más exhaustivo realizado mediante

curvas de disociación o curvas “melting” que permiten confirmar la secuencia del producto amplificado (Ponchel *et al.*, 2003; Valasek y Repa 2005).

Los sistemas de detección específicos se basan en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las moléculas, tal cual como sucede con las sondas de hidrólisis conocidas comercialmente como Taqman. La sonda Taqman es un fragmento corto de ADN marcado con un fluoróforo donador en el extremo 5' el cual emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la energía liberada por el donador. La emisión de la fluorescencia se produce cuando la enzima Taq polimerasa con acción exonucleasa 5'-3' se adhiere al ADN molde para iniciar la síntesis de la cadena complementaria durante la extensión, cuando la enzima hidroliza el extremo 5' de la sonda Taqman, se libera el fluoróforo donador separándolo del aceptor produciendo una emisión de la fluorescencia en forma irreversible que es captada por el detector. La especificidad es una de las principales ventajas al usar sondas Taqman, ya que se diseña para que se una al fragmento de ADN que se va a amplificar por complementariedad (Valasek y Repa 2005; Wong y Medrano 2005).

2.3.4 Región ITS

El espaciador interno transcrito (ITS) son regiones no codificantes del ADN ribosomal (ADNr) altamente conservadas que se ubican entre las subunidades ribosomales 18S, 5.8S y 28S (Figura 2).

Estas regiones son utilizadas para la caracterización molecular de hongos debido a que son relativamente cortas (500-800 pb), de fácil amplificación, aunque se utilicen muestras pequeñas o muy diluidas, además varían morfológicamente entre especies permitiendo realizar investigaciones sobre tipificación genética (Bridge y Arora 1998; Nakamura *et al.*, 1998). En el caso del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* el análisis va dirigido a la región ITS1 y a un fragmento de la subunidad ribosomal 5.8s.

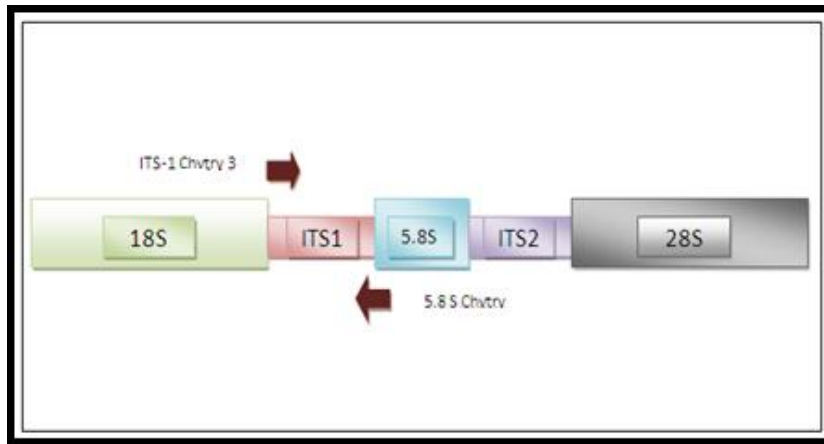


Figura 2. Representación gráfica del ADN ribosomal (ADNr) mostrando el espacio interno transcrito 1 (ITS1) (rojo) y la subunidad 5.8S (Azul), con la ubicación de los primers utilizados para la amplificación (Modificado de Nakamura *et al.*, 1998)

2.3.5 Análisis de los datos

El análisis de los datos se basa en las curvas de amplificación, donde se representa la fluorescencia en función del número de ciclos de PCR (Figura 3).

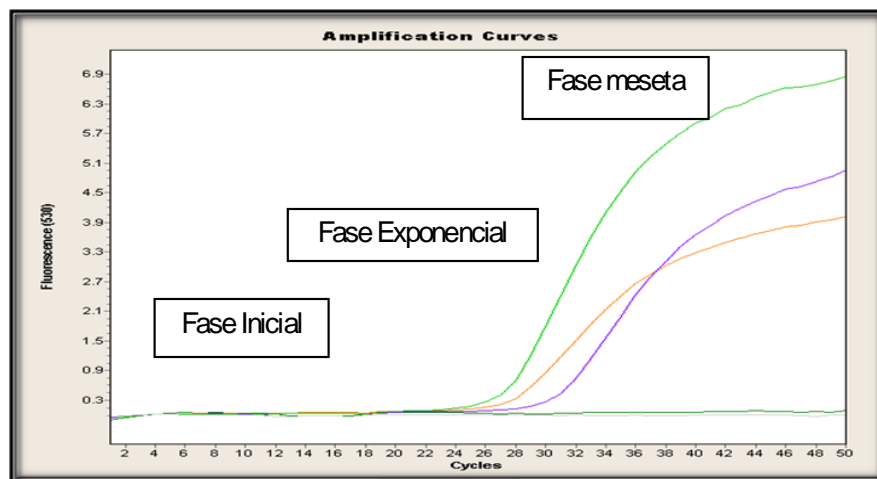


Figura 3. Curva de amplificación de la PCR en tiempo real (Modificado de Pinilla *et al.*, 2008).

El análisis de datos está determinado por dos parámetros importantes como son el Ct y la eficiencia. El Ct o ciclo umbral es el ciclo en el cual la fluorescencia emitida está

por encima del “background” que determina la fase inicial de amplificación, siendo inversamente proporcional a la concentración presente en la muestra. La eficiencia en la PCR en tiempo real indica la cuantificación del ADN. Esta eficiencia aparentemente equivale al 100% ya que teóricamente los amplicones específicos se duplican ciclo a ciclo, pero en realidad se encuentra en un rango entre 65 y el 90% ya que depende realmente de factores y contaminantes que puedan inhibir la PCR (Pfaffl 2001; Valasek y Repa 2005; Schefe *et al.*, 2006).

La cinética de la PCR en tiempo real presenta tres fases (Pfaffl 2004; Wong y Medrano 2005) (Figura 3):

- **Fase Inicial:** Es la fase donde no existe cambios en la fluorescencia y define la línea basal.
- **Fase exponencial:** en esta fase hay un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta el número de copias de ADN. La cinética de esta fase se describe con la ecuación:

$$R_n = R_0 \cdot (1+E)^n$$

R_n = Número de moléculas amplificadas

R_0 = Número de moléculas iniciales

n = Número de ciclos

E = Eficiencia de la reacción.

- **Fase de meseta:** es la fase final donde no se observan cambios en la fluorescencia porque los productos de reacción se consumen y se disminuye la velocidad de reacción.

La cuantificación de las muestras se realiza mediante la elaboración de una curva de calibración basada en el uso de estándares con concentraciones conocidas elaborados en diluciones seriales. La curva origina una relación lineal entre el Ct y la concentración de los estándares permitiendo determinar la concentración de las muestras según los valores del Ct. Este método asume una eficiencia de amplificación entre la muestra y el estándar que se puede terminar mediante el coeficiente de correlación (R^2) (Bustin *et al.*, 2005; Wong y Medrano 2005).

Durante la amplificación de las muestras se pueden presentar algunos inconvenientes como la presencia de falsos positivos, los cuales son generados por contaminación de las muestras durante la extracción del ADN, o contaminación del blanco durante la preparación de los reactivos. Estos falsos negativos pueden ser identificados cuando se obtiene amplificaciones tardías y Ct muy altos, cuyo valor se encuentra ubicado en últimos ciclos del montaje, de igual manera para minimizar este riesgo se utilizan testigos positivos y controles negativos que permitan monitorear la reacción (Torres y Baca 1995).

2.4 Distribución de *Batrachochytrium dendrobatidis*

La distribución mundial del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* ha sido un enigma hasta hoy, su origen es desconocido por lo cual se han desarrollado dos hipótesis de distribución de la quitridiomicosis. La primera hipótesis señala que el hongo ha sido diseminado por la introducción de especies foráneas, y el desplazamiento humano por las zonas contaminadas (Rachowicz *et al.*, 2005; Fisher y Garner 2007). Esta hipótesis es respaldada por las investigaciones realizadas por Weldon y colaboradores (2004), el cual sugiere que el patógeno proviene de África, donde las ranas de la especie *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis* son originarias. Al parecer estos anfibios son portadores del hongo y fueron altamente comercializados, principalmente en la década de los años 40-50's para ser utilizados en las pruebas de embarazo, quienes posteriormente fueron liberadas en estanques y jardines cuando se desarrollaron las pruebas actuales. La segunda hipótesis sugiere que la aparición de la enfermedad se debe a cambios en el comportamiento del patógeno, del sistema inmunológico de las especies y a la creación de entornos más favorables para *B. dendrobatidis*, debido alteraciones en el medio ambiente (Rachowicz *et al.*, 2005).

El hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* ha sido reportado a nivel global en los 5 continentes (www.bd-maps.net) (Figura 4). A continuación se relacionan los principales estudios desarrollados en América

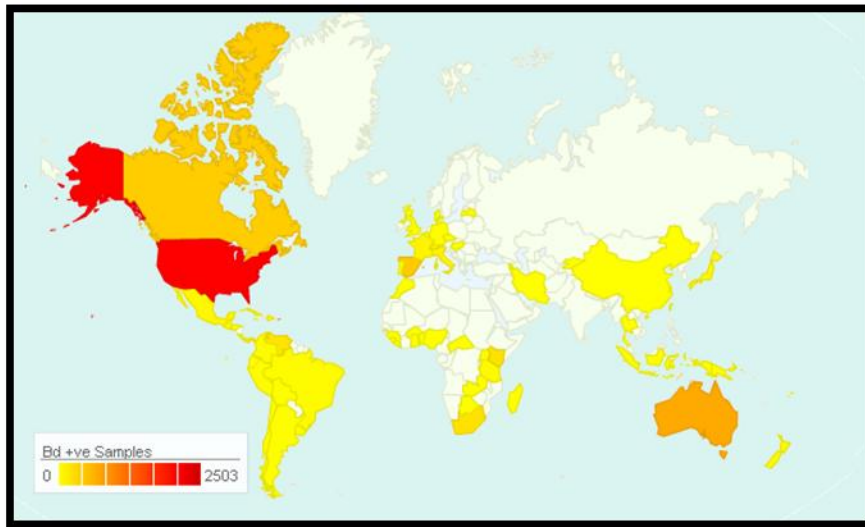


Figura 4. Distribución mundial del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (www.bd-maps.net).

2.4.1 Norteamérica

Norteamérica es el área geográfica donde más estudios y reportes se han realizado sobre la quitridiomycosis, principalmente en Estados Unidos, en el año 2001 se realizó el reporte de la enfermedad en anfibios preservados desde 1976 perteneciente a la especie *Bufo canorus* (Green y Sherman 2001). En Arizona, en el año 2002, se registró que anfibios de las especies *Rana yavapaiensis*, *Rana chiricauensis* e *Hyla arenicolor* habían muerto por quitridiomycosis en los años comprendidos entre 1992-1999 (Bradley *et al.*, 2002). En el 2003, *B. dendrobatidis* fue encontrado en salamandras *Ambystoma tigrinum stebbinsi* recogidas al sur de Arizona, observando que no murieron después de 60 días de enfermedad por lo cual dedujeron que podían actuar como reservorio de la enfermedad (Davidson *et al.*, 2003). En Hawai, Beard y O'Neill (2005) estudiaron la especie *Eleutherodactylus coqui* introducida en 1980, la cual fue positiva para la enfermedad en 4 de los sitios muestreados, mostrando una baja tasa de infección. En el año 2006, se estudió el impacto y la variación de especies introducidas como *Lithobates catesbeianus* en países como Canadá, Estados Unidos, Brasil, Uruguay, Francia, Italia y Japón, mediante PCR en tiempo real y

análisis histológico. Peterson y colaboradores en el año 2007 y Schlaepfer y colaboradores en el año 2007, determinaron la prevalencia de *B. dendrobatidis* en poblaciones de *Lithobates catesbeianus* y *Rana yavapaiensis* en localidades del sur de California y Arizona. Pico y Collins (2008) muestrearon individuos de la especie *Ambystoma tigrinum* los cuales fueron utilizados en el comercio de carnadas en el Oeste de Estados Unidos para saber si las salamandras liberadas son posibles vectores de la enfermedad. Investigaciones realizadas en el año 2009, en la Universidad de Minnesota, verificaron la presencia del hongo en el parque estatal Itaska, encontrando altas tasas de infección en tres especies (*Lithobates pipiens*, *Lithobates septentrionalis* y *Lithobates sylvaticus*) (Martinez *et al.*, 2009). Hossack y colaboradores (2010) determinaron la prevalencia de la enfermedad en anfibios asociados a cuerpos de agua en dos especies de ranas y en 7 especies de salamandras en localidades del noroeste del Pacífico, norte de las Montañas Rocosas y en las Montañas Apalaches en Estados Unidos.

En Canadá Ouellet y colaboradores (2005) investigaron los antecedentes históricos y el nivel infeccioso de este patógeno en anfibios postmetamórficos y adultos recolectados entre 1985 y 2001 en localidades de Quebec que evidenciaron el primer caso de quitridiomycosis en Norte América en dos ranas de la especie *Rana clamitans* colectadas en 1961. En el 2009 y en el 2010 se estudió principalmente la prevalencia en Columbia Británica.

2.3.1 Centroamérica

En Centroamérica la enfermedad fue reportada por primera vez en Panamá por Berger y colaboradores (1998) mediante técnicas de histología en anfibios que habían presentado muertes en masa en la Reserva Forestal Fortuna durante 1997. En el 2003, Lips y colaboradores realizaron un rastreo de los anfibios en la localidad de las Tablas (Costa Rica) debido a los episodios de declive presentados, siendo positiva a la presencia de *B. dendrobatidis* la especie *Atelopus chiriquiensis*. Para el año 2004, se realizó el primer reporte para México en 4 regiones de Guerrero y Oaxaca (Lips *et*

al., 2004) e igualmente en este año en Guatemala se registraron renacuajos con síntomas de la enfermedad en la especie *Ptychohyala hypomykter* y *Plectrohyla quechi* en un bosque nublado en la Sierra de las Minas (Mendelson *et al.*, 2004). En Puerto Rico también se reportó la presencia de *B. dendrobatidis* en la especie endémica *Eleutherodactylus coqui*, y aportaron datos del costo de la evolución de la enfermedad en la vulnerabilidad de esta misma especie (Burrowes *et al.*, 2004). Puschendorf y colaboradores (2006b) examinaron 30 especies de tierras altas y 18 especies de tierras bajas, mediante cortes histológicos, de las cuales fueron positivos anfibios de la especie *Eleutherodactylus altae* y *Craugastor melanostictus*; de igual manera diagnosticaron, mediante análisis histológicos, a anfibios del Parque Nacional Pico Bonito de Honduras, donde concluyeron que las especies *Eleutherodactylus aurilegulus* y la *Rana maculata* presentaban la sintomatología característica de la enfermedad. En el año 2007, Felger y colaboradores, estudiaron la presencia de la quitridiomycosis en el Salvador en especies de *Agalychnis moreletii* y *Rana maculata*. las cuales fueron positivas a la presencia del patógeno. En este mismo año en Cuba se manifestó la quitridiomycosis en la especie *Bufo longinasus* la cual presentaba síntomas de la enfermedad como aletargamiento e hiperqueratosis. Esta especie es endémica de la isla y se encuentra en peligro de extinción (Díaz *et al.*, 2007). En el año 2008 se realizó un seguimiento en tres localidades al oeste de Panamá en el Parque Nacional Campana detectando tres especies positivas, cuya prevalencia sugirió que la quitridiomycosis podría ser enzoótica en el parque (Woodhams *et al.*, 2008). Frias y colaboradores (2008), muestrearon 45 localidades pertenecientes a 12 regiones de México mediante PCR en tiempo real detectando la presencia del hongo patógeno en las especies *Agalychnis moreletii*, *Ambystoma altanirani*, *A. granulatum*, *A. mexicanum*, *A. rivulare*, *A. velasci*, *Hyla euphorbiaceae*, *H. eximia*, *Exerodonta melanomma*, *Pachymedusa dacnicolor*, *Rana megapoda*, *R. montezumae*, *R. neovolcanica*, *R. spectabilis*. Para el año 2009 se realizó un modelo de predicción, el cual consistió en medir la prevalencia y la ocurrencia del *B. dendrobatidis* en Costa Rica. Este modelo permitió deducir que el patógeno no presentaba una distribución uniforme mostrando, una mayor probabilidad de posicionarse en la Región del Caribe que en la vertiente del Pacífico

(Puschendorf *et al.*, 2009). En el año 2011 se realizó un estudio que ha permitido determinar la prevalencia del patógeno en las zonas con diferentes gradientes altitudinales (45m - 1215m) de Panamá incluyendo zonas donde se había detectado la enfermedad (Kilburn *et al.*, 2011).

2.3.2 Suramérica

Los primeros reportes de *Batrachochytrium dendrobatidis* fueron en Ecuador donde Ron y Merino (2000) le atribuyeron a *B. dendrobatidis* la extinción de la especie *Telmatobius niger* la cual dejó de ser reportada desde 1994. Los individuos muestreados se encontraron muertos presentando síntomas como ulceraciones y secreciones. Posteriormente, Bonaccorso y colaboradores (2003) en Venezuela realizaron el análisis histológico a 59 especímenes preservados para colección, observando hiperqueratosis y zoosporangios de *B. dendrobatidis* en un anfibio de la especie *Atelopus cruciger* colectado en 1986. En el año 2004, Hanselmann y colaboradores examinaron muestras de especies introducidas de *Lithobates catesbeianus*, presentando una alta prevalencia de la enfermedad a pesar que las especies no presentaron signos clínicos aparentes. Para el año 2005, Herrera y colaboradores presentaron el primer reporte de *B. dendrobatidis* en Argentina detectado en anfibios muertos pertenecientes a la especie *Leptodactylus ocellatus*. Barrionuevo y Mangione (2006) diagnosticaron la presencia de *B. dendrobatidis* en especímenes muertos de *Telmatobius atacamensis* y *Telmatobius pisano* que fueron colectados entre el 2003-2005, donde se identificaron zoosporangios en diferentes etapas mediante análisis histológicos. Carnaval y colaboradores (2006) reportaron la enfermedad para Brasil en anuros colectados desde 1981 de las especies asociadas a cuerpos de agua (*Colostethus olfersioides*, *Bokermannohyla gouveai*, *Hypsiboas freicanecae*, *Thoropa miliaris* y *Crossodactylus caramaschi*), demostrando una baja ocurrencia de la enfermedad. Seimon y colaboradores en el año 2007, reportaron a *B. dendrobatidis* en los Andes del Perú en las especies *Pleurodema marmorata* y *Telmatobius marmoratus* que fueron encontrados muertos. El primer reporte de quitridiomycosis en Bolivia fue en el año 2008 en renacuajos de la especie endémica

Rhinella quechua, mediante técnicas histológicas que detectaron deformaciones en la región oral (Barrionuevo *et al.*, 2008). Sánchez y colaboradores (2008) realizaron un estudio en la Cordillera de Mérida en gradientes altitudinales entre los 80 y 2600m en varios tipos de vegetación siendo positivas 10 especies nativas (*Dendropsophus meridensis*, *Gastrotheca nicefori*, *Hypsiboas crepitans*, *Hyloscirtus jahni*, *Hyloscirtus platydactylus*, *Mannophryne collaris*, *Engystomops pustulosus*, *Pseudis paradoxa* y *Scarthyla vigilans*), 1 especie exógena (*Lithobates catesbeianus*). En el año 2010, muestreos realizados en los años 2006-2007 a especies introducidas de *Xenopus laevis* con una prevalencia en las poblaciones estudiadas del 24%, permitieron inferir que la rápida dispersión de esta rana en Chile contribuyó a la diseminación del patógeno (Solis *et al.*, 2010).

2.3.3 *Batrachochytrium dendrobatidis* en Colombia.

Los reportes de quitridiomycosis en Colombia han sido escasos a pesar de la gran diversidad de anfibios, donde incluyen especies endémicas cuya distribución es altamente restringida (Acosta-Galvis 2000), adicionalmente se evidencia la presencia de especies invasoras como *Lithobates catesbeianus* (Rueda-Almonacid 1999) la cual se ha reportado como vector del hongo *B. dendrobatidis* en otros países.

El primer reporte de *Batrachochytrium dendrobatidis* en el país fue realizado por Ruiz y Rueda-Almonacid en el año 2008, en especies de colección pertenecientes al Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional, Museo de Historia Natural de la Pontificia Universidad Javeriana y el Instituto Alexander Von Humboldt. Se examinaron mediante análisis histológicos, 672 especies colectadas entre 1968 y 2006 en 17 departamentos. Cinco (5) especímenes fueron positivos para *B. dendrobatidis* que fueron capturados en los años 2004 y 2005, correspondientes a las especies *Atelopus mittermeieri*, *Hyloscirtus bogotensis* y *Eleutherodactylus elegans*, los cuales se colectaron en las localidades del Santuario de Fauna y Flora de Guanentá (Santander), la cueva de los Moyas en la Calera y en el Parque Ecológico de Matarredonda en Choachí-Cundinamarca. El segundo reporte fue realizado ese

mismo año por Velásquez y colaboradores, en localidades pertenecientes a la vertiente Occidental de la cordillera Oriental en el departamento del Valle del Cauca, donde se incluyó El Boquerón o Reserva Natural Cerro del Inglés, en el cual se presentaron muertes masivas en el año 1997 (Lynch y Grant 1998). Se analizaron 466 individuos pertenecientes a 40 especies mediante técnicas histológicas, siendo positivos 22 espécimen para *B. dendrobatidis* correspondientes a 4 localidades. Adicionalmente, este estudio permitió registrar el reporte más antiguo de quitridiomycosis en nuestro país el cual data de 1994 para la especie *Hyloxalus fascianigrus*. La Universidad de los Andes realizó estudios en 13 localidades mediante PCR convencional, donde se incluyeron zonas reportadas anteriormente por Ruiz y Rueda-Almonacid en el 2008. En los resultados reportados 16 anfibios fueron positivos a la presencia de *B. dendrobatidis* pertenecientes a las especies *Dendropsophus labialis*, *Pristimantis elegans*, *Hyloxalus* sp. "ibague", *Rheobates palmatus*, *Pristimantis* sp.3, *Pristimantis savagei*, *Pristimantis* sp.1 y *Rhinella sternosignata* distribuidos en 7 localidades ubicadas entre los 500 y los 3200 m de altura (Quintero 2008).

2.4 Mecanismos de defensa de los anfibios frente a *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Muchos anfibios han desarrollado mecanismos de defensa para contrarrestar la patogenicidad ocasionada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Estudios realizados han demostrado que algunos animales infectados tiene la capacidad de aumentar la temperatura corporal eliminando a *B. dendrobatidis* en periodos cortos de tiempo (Woodhams *et al.*, 2003; Richmond *et al.*, 2009). Otros trabajos demostraron que anuros de especies pertenecientes a las familias Bombinatoridae, Hylidae, Hyperoliidae, Leiopelmatidae, Leptodactylidae, Myobatrachidae, Pipidae y Ranidae generan péptidos antimicrobianos como respuesta innata de defensa contra la enfermedad, permitiendo aumentar sus probabilidades de supervivencia (Woodhams *et al.*, 2006a; Woodhams *et al.*, 2006b; Woodhams *et al.*, 2007; Conlon *et al.*, 2009a; Melzer y Bishop 2010; Conlon *et al.*, 2011). Adicionalmente, se han evidenciado

relaciones simbióticas entre los anfibios y algunas bacterias que inhiben el crecimiento del hongo (Brucker *et al.*, 2008a; Brucker *et al.*, 2008b). Los primeros estudios realizados para comprender esta interacción, fueron en el año 2007, aislando la microflora de salamandras de la especie *Plethodon cinereus* donde se identificaron bacterias del género *Lysobacter*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium* y *Bacillus* (Laurer *et al.*, 2007). Woodhams y colaboradores (2007), realizaron el primer estudio en anuros de la especie *Rana muscosa* provenientes de dos poblaciones, localizadas en los Parques Nacionales Kings Canyon y Yosemite en California (Estados Unidos), donde analizaron y cuantificaron péptidos e identificaron las bacterias presentes en la piel de estos anfibios. Posteriormente en el año 2008, Laurer y colaboradores, compararon la diversidad de la microbiota bacteriana provenientes de la piel de salamandras de la especie *Hemidactylium scutatum* mediante métodos moleculares, detectando 48 especies de bacterias antifúngicas, siendo las más representativas *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Flavobacterium* sp. y *Janthinobacterium lividum*. Durante el 2008, Brucker y colaboradores, mediante análisis de espectrofotometría de masas de alta resolución, cromatografía, resonancia magnética y UV-visible, detectaron metabolitos secundarios de las bacterias *Lysobacter gummosus* (2,4-diacetylphloroglucinol) y de *Janthinobacterium lividum* (indol-3 carboxaldehído y la violaceína) los cuales inhiben en bajas concentraciones a *B. dendrobatidis*. En el año 2009, Harris y colaboradores expusieron a tres grupos de *Rana muscosa* o rana de montaña de patas amarillas a *B. dendrobatidis* y a *J. lividum* para determinar la interacción del patógeno frente a la bacteria, determinado que hubo una reducción en cuanto a la morbilidad y mortalidad de la especie en estudio. En este mismo año (2009) Brecker y colaboradores, determinaron que la concentración mínima de violaceína en la piel de la salamandra *Plethodon cinereus* para impedir la morbilidad y mortalidad ocasionada por *B. dendrobatidis* es de 1.8 μM . Para el año 2010, Lam y colaboradores realizaron una investigación en poblaciones relacionadas a las *Rana muscosa*, donde las comunidades presentaban bacterias anti-Bd, confirmando la microbiota presente en la piel de los anfibios y determinando que los microorganismos encontrados no fueron significativamente diferentes entre los individuos.

2.4.1 Características de *Janthinobacterium lividum*

La bacteria *Janthinobacterium lividum* es un bacilo Gram-negativo, aerobio estricto, que puede crecer en un rango de temperatura entre 2°C - 32°C, ha sido aislada de suelos y cuerpos de agua como ríos lagos y marantiales (Gillis y De Ley 2006; Pantanella *et al.*, 2007) (Figura 5).

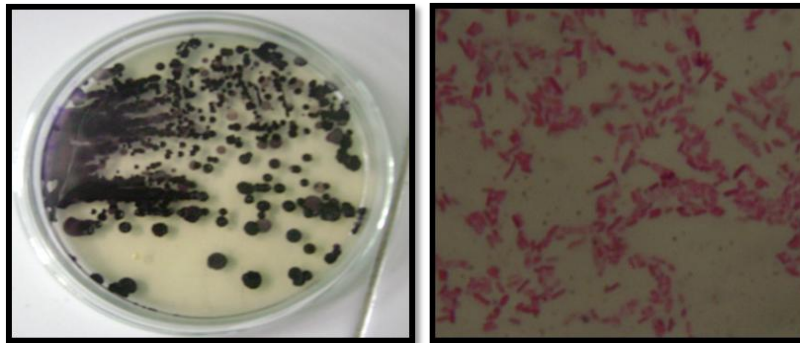


Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas de *Janthinobacterium lividum*.

Esta bacteria se ha reportado como oportunista en peces, ocasionando ulceraciones y una alta mortalidad principalmente en la especie *Oncorhynchus mykiss* o trucha arcoíris, en países como Escocia (Austin *et al.*, 1992; Austin *et al.*, 2003). *J. lividum* se caracteriza por la síntesis de metabolitos secundarios de coloración violeta en condiciones sésiles mediante la creación de biopelículas reguladas por mecanismos de “quorum sensing” (Pantanella *et al.*, 2007). Este pigmento es un compuesto químico conocido como violaceína (C₂₀-H₁₃-N₃-O₃), cuya función es proteger a la bacteria contra la radiación ultravioleta y otros microorganismos. La violaceína es codificada por un operón constituido por los genes *vioD*, *vioC*, *vioB* y *vioA*, que permiten la síntesis del compuesto a partir 2 dos moléculas de triptófano (Regina y Creczynski-Pasa 2004). Entre sus propiedades físicas se encuentra que es insoluble en agua, pero soluble en etanol, metanol, acetona y acetato de etilo, tiene una masa molecular de 343.3 g·mol⁻¹, un punto de fusión de 290°C y un espectro de emisión máximo de 575nm en etanol, adicionalmente tiene características antifúngicas, antibacteriales, antiparasitarias y antivirales (Duran *et al.*, 2007).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Zona de estudio.

La toma de muestras de la población de anfibios se realizó en 13 localidades ubicadas en municipios pertenecientes a la región Andina Central, Oriental, Orinoquia y Amazonia, en un rango altitudinal entre los 200 y los 3549 m, con temperaturas promedio entre 11°C - 30°C y humedad relativa entre 62% y 96%. En este estudio se incluyó el Santuario de Fauna y Flora de Guanentá en Santander donde ha sido reportada la enfermedad (Ruiz y Rueda-Almonacid 2008) (Anexo1).

3.2 Recolección de las muestras

Los anfibios fueron capturados al inicio de la temporada de lluvia 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. Posteriormente se realizó la toma de muestras según el protocolo de toma de muestras 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, de 20 a 30 veces por duplicado, como se observa en la Figura 6. A continuación, 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 ambientales (Altitud, % Humedad, Temperatura), c) Especie, d) Hábitat, e) Modo Reproductivo.



Figura 6. Toma de muestras de la población anfibia por el método del hisopo según el protocolo de Vredenburg y Briggs (2004-2007). Fotos Acosta Galvis 2009.

3.3 Análisis por PCR en tiempo real

3.3.1 Extracción de ADN.

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[®]) y se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 30 seg (Sorvall Biofuge primo[®]), a continuación se realizó una incubación a 100°C en un baño termostático durante 10 min, y otra incubación a 0°C durante 2 min. Consecutivamente cada una de las muestras se centrifugó a 13000 r.p.m. por 3 min (Sorvall Biofuge primo[®]). El ADN extraído fue cuantificado en un Nanodrop Thermo scientific 2000c[®] y conservado a -20°C hasta el montaje por PCR en tiempo real (Boyle *et al.*, 2004; Hyatt *et al.*, 2007).

3.3.2 Optimización de las condiciones de amplificación de la PCR en tiempo real.

Para el diagnóstico mediante PCR en tiempo real se siguió la técnica utilizada por Boyle *et al.* (2004), pero debido a que el equipo utilizado fue Light Cycler 1.5 de Roche® se realizó la optimización de las condiciones de amplificación, donde se ejecutaron nueve ensayos en los cuales se modificó la temperatura y el tiempo en las etapas de hibridación, elongación y fase de lectura.

3.3.3 Amplificación de la secuencia de ADN_r perteneciente a la región ITS-1 y a la sub unidad 5.8S por PCR en Tiempo real.

Una vez obtenido el ADN producto de la extracción, se amplificó por PCR en tiempo real la secuencia de ADN_r perteneciente a la región ITS-1 y a la sub unidad 5.8s, utilizando los primers ITS1-3Chytr 5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3' (29 bases) como *forward* y el 5.8sChytr 5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAA-3' (22 bases) como *reverse* a una concentración de 9 µM. Para la emisión de la fluorescencia se utilizó la sonda de hidrólisis TaqMan *hot start* de Roche® 5'-6FAMCGAGTCGAACAAAATMGBNFQ-3' (15 bases) a una concentración 2.5µM.

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20µl así:

- 9 µl de Agua de PCR.
- 2µl de solución de primer y sonda previamente preparados.
- 4µl de Master Mix de Roche® que contiene la enzima Taq ADN polimerasa, la solución tampón, el MgCl₂ y la mezcla de dNTP.
- 5µl de ADN producto de la extracción de cada muestra.

El volumen total de la mezcla (20µl) se sirvió en cada capilar, estos fueron sellados y homogenizados a 2500 r.p.m. por 5 seg (Sorvall Biofuge primo®) y transferidos al termociclador Light Cycler 2.0 de Roche® utilizando las condiciones que se establecieron en la optimización de PCR, las cuales fueron:

- Pre-Denaturación 95°C por 10 minutos
- Denaturación 95°C por 15 segundos
- Hibridación 60°C por 1 minuto
- Elongación 72°C por 2 segundos
- Enfriamiento 40°C por 30 segundos

Se realizó la lectura en la fase de extensión a una longitud de onda de 530 nm durante 50 ciclos. Se utilizó como control positivo el estándar proveniente del Australian Animal Health Laboratory, utilizando concentraciones de 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 zoosporas y el ADN extraído de la cepa EV001 donada por el laboratorio de micología de la Universidad de los Andes; se utilizó agua de PCR como control negativo. Cada muestra se analizó por duplicado, realizando repeticiones a aquellas que presentaban lecturas mayores a 1 equivalente de zoosporas para confirmar el resultado positivo (Boyle *et al.*, 2004; Hyatt *et al.*, 2007).

3.3.4 Cuantificación de las muestras

Para la cuantificación de las muestras positivas se realizó una curva de calibración por triplicado de cada dilución, utilizando soluciones estándar de 10^3 , 10^2 , 10^1 , y 10^0 , como blanco se utilizó agua de PCR. Los resultados fueron representados gráficamente como el semi-logaritmo de la concentración en función del Ct y los datos obtenidos se reemplazaron en la ecuación de la recta para hallar la concentración de cada muestra positiva (Boyle *et al.*, 2004).

3.3.5. Análisis estadístico

Para medir la probabilidad de que las variables ambientales (altitud, temperatura y % humedad) tomadas durante el muestreo, se encontraran asociadas con la presencia o ausencia del patógeno, se realizó una regresión logística binaria utilizando el programa SPSS 1.8[®]. Adicionalmente se realizó una regresión lineal simple con cada una de las variables, para determinar si existe una relación entre la altitud, temperatura, y % humedad con la concentración de zoosporas

3.4 Referenciación geográfica de la distribución de la enfermedad en las zonas determinadas para el muestreo de los anfibios.

Con el fin de determinar la ubicación espacial de la detección del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, en las regiones de muestreo, mediante el programa ARC VIEW ESRI 2002[®], se realizó un mapa de distribución representando la localización geográfica de los ejemplares positivos.

3.5 Estudio de la fisiología de *Janthinobacterium lividum* para determinar el mecanismo de antagonismo frente a *Batrachochytrium dendrobatidis*

A partir de la cepa (EV001) de *Batrachochytrium dendrobatidis* donada por el laboratorio de Micología de la Universidad de los Andes, aislamiento colombiano y de una cepa de *Janthinobacterium lividum*, donada por el laboratorio de Herpetología de San Francisco State University (Estados Unidos), se realizaron los ensayos de antagonismo entre el hongo y la bacteria.

3.5.1 Curva de crecimiento de la bacteria *Janthinobacterium lividum*.

La cepa de *Janthinobacterium lividum* se inoculó en 20mL de caldo triptona (1%), a continuación se incubó por 48 horas a una temperatura de 24°C, pasado este tiempo se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 540nm en un espectrofotómetro Genesys 2.0[®], ajustando la concentración a un equivalente de 10^5 células·mL⁻¹, con el fin de obtener el preinóculo. Posteriormente, se realizaron diluciones hasta una concentración de 10^4 células·mL⁻¹, para iniciar la curva de crecimiento; este inóculo fue incubado en agitación a 180 r.p.m. durante 72 horas a 24°C (Pantanella *et al.*, 2007).

Se tomaron alícuotas de 1500µL cada 4 horas en condiciones estériles, las cuales fueron distribuidas de la siguiente manera:

- 1000µL para determinar el número de células totales por densidad óptica,
- 150µL para recuento en cámara de Neubauer.

- 200µL para las diluciones (1/10) necesarias para la siembra.
- 150µL para células viables por recuento en placa.

3.5.2 Ensayo inhibitorio

Se evaluó el antagonismo *in-vitro* de *Janthinobacterium lividum* frente a *Batrachochytrium dendrobatidis* por difusión de metabolito en pozos, para lo cual se realizó la siembra masiva por triplicado del hongo en agar TGhL y se incubó a 23°C durante ocho días; pasado este lapso de tiempo se realizaron 3 cortes en el agar (7mm de diámetro) para la formación de los pozos a una distancia de 5cm uno del otro formando un triángulo equilátero. A continuación se colocó en cada uno de los pozos un corte de agar con *Janthinobacterium lividum* (previamente sembrada), del mismo tamaño del pozo. Los cortes se realizaron cuando el crecimiento de la bacteria estaba en la hora 36 y 52 de incubación, adicionalmente se utilizaron cortes de agar triptona (1%) sin ningún crecimiento microbiano para ser utilizado como control. El ensayo se incubó a 23°C durante 10 días. Después de la incubación se midió la inhibición del crecimiento del *B.d.* en mm a cada uno de los montajes realizados (Valgas *et al.*, 2007).

4. RESULTADOS

4.1 Optimización de PCR en tiempo real

Los ensayos realizados para la optimización de las condiciones de amplificación se basaron en la modificación de factores como: temperatura, tiempo y fase de lectura (Tabla 1). Estas condiciones fueron establecidas debido a que los análisis se realizaron en el termociclador Light Cycler 1.5 de Roche[®] y el protocolo base para la detección de *B. dendrobatidis* se desarrolló en un termociclador ABI Prism 7700[®] (Boyle *et al.*, 2004).

Tabla 1. Condiciones de amplificación de la PCR en Tiempo real

Ensayo N°	T° Hibridación	Tiempo	T° Elongación	Tiempo	Lectura
1	60°C	1 min			Hibridación
2	60°C	15 seg			Hibridación
3	60°C	15 seg	72°C	10 seg	Hibridación
4	60°C	1 min	72°C	2 seg	Elongación
5	60°C	15 seg	72°C	10 seg	Elongación
6	68°C	1 min			Hibridación
7	68°C	15 seg	72°C	2 seg	Hibridación
8	68°C	1 min	72°C	2 seg	Elongación
9	68°C	15 seg	72°C	10 seg	Elongación

Los ensayos 1 y 2 se realizaron teniendo en cuenta el protocolo descrito por Boyle y colaboradores (2004), modificando los tiempos de hibridación. En los ensayos 3, 4 y 5 se incluyó la temperatura de extensión de la Taq polimerasa (72°C), modificando los tiempos de hibridación y elongación, así como la fase de lectura. En los ensayos del 6 al 9 se realizaron promedios entre la temperatura de hibridación de los primers (60°C) y de elongación de enzima (72°C) dando un valor de 68°C, el cual fue

utilizado durante la etapa de anillamiento; se modificó la temperatura y el tiempo de extensión de la Taq polimerasa y la fase de lectura. De los 9 ensayos realizados para la establecer las condiciones óptimas que permitieran la amplificación de las muestras, el ensayo 4 fue el que mejor resultado presentó, ya que con estos tiempos y temperaturas, amplificaron los estándares utilizados.

4.2 Curva de calibración

Para la cuantificación de las muestras se realizó una curva de calibración con cuatro concentraciones (10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0) (Figura 7).

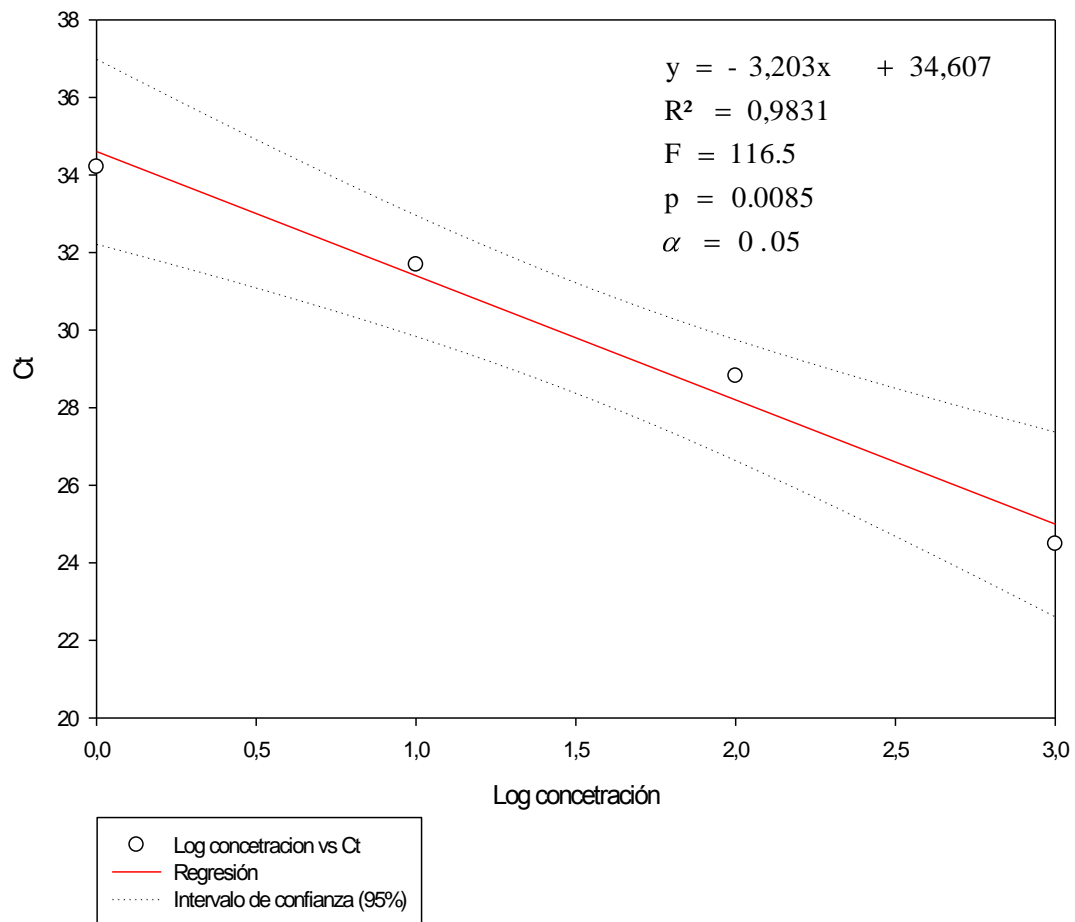


Figura 7. Curva de calibración de la PCR en tiempo real

Los datos arrojados por la ecuación de la recta indican que se obtuvo una pendiente de -3.203 y un factor de correlación de (R^2) 0.9915, la eficiencia obtenida mediante la ecuación de $10^{-1/m}$ fue del 100%, con una sensibilidad de 1 equivalente zoospora debido a que concentraciones menores a 10^0 no amplificaron. Adicionalmente se observa que los datos de la curva de calibración se encuentran dentro de un intervalo de confianza del 95% (Figura 7); la prueba de F realizada para la regresión lineal en el programa SigmaPlot[®] arroja una alta significancia ($p=0.0085$) (Anexo 2), que demuestra que las variables medidas (Ct y log de la concentración) se encuentran correlacionadas.

En cuanto a los valores de la media del Ct, correspondientes a las concentraciones utilizadas (Anexo 3) se encontraron dentro de los criterios de cuantificación proporcionados por CSIRO's Australian Animal Health Laboratory (AAHL) y por Hyatt y colaboradores (2007), en el ensayo de reproductibilidad de la PCR en tiempo real, utilizando la sonda TaqMan.

4.3 Control de extracción de ADN

Debido a que las muestras obtenidas son ambientales y van acompañadas de contaminantes (hojas, lodos y demás residuos sólidos), que pueden inhibir y alterar la sensibilidad de la PCR en tiempo real; se procedió a confirmar el protocolo de extracción con PrepMan Ultra (Applied Biosystems[®]) a partir de la cepa Ev001 donada por el laboratorio de Micología de la Universidad de los Andes, antes de realizar el proceso en la muestras.

Los resultados de la cuantificación realizada en el Nanodrop Thermo Scientific 2000c[®] arrojaron una concentración de ADN total de $482.1 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ con una relación proteína/ADN (280/260) de 1.80, al realizar el montaje en la PCR en tiempo real según las condiciones establecidas en la optimización, se obtuvo un valor de Ct de 18.27 (Anexo 4).

4.4 Resultados PCR en tiempo real

4.4.1 Especies encontradas

Durante la etapa de desarrollo del proyecto, se realizaron un total de 28 muestreos, distribuidos en 13 localidades donde se analizaron 336 muestras de anfibios del orden Apoda (1), Caudata (5), y Anura (330) representados en 12 familias y 56 especies. Las familias más representativas fueron Hylidae con un 30%, Strabomantidae con un 23% y Leptodactylidae con un 12%; en cuanto a las familias Aromobatidae y Bufonidae los porcentajes de anfibios encontrados fueron menores (3% y 9% respectivamente) en comparación con las otras familias encontradas (Figura 8).

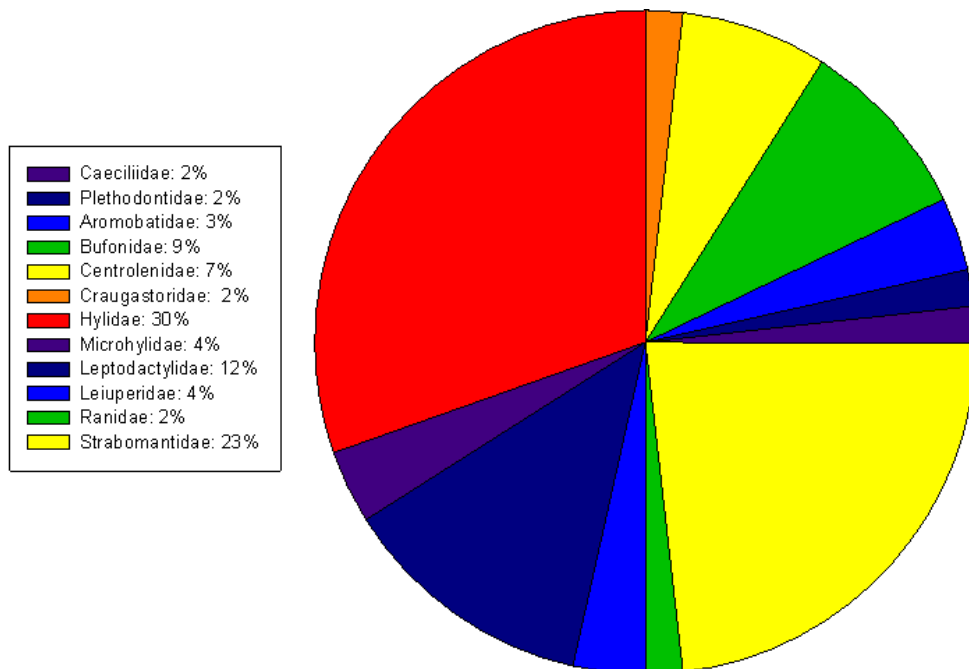


Figura 8. Porcentaje de familias de anfibios registrados durante el muestreo en los 13 municipios de la región Andina Central, Oriental, Amazonia y Orinoquia.

De las 56 especies muestreadas 5 individuos se hallaban en etapa metamórfica y 331 en etapa adulta. Adicionalmente, la especie *Leptodactylus macrosternum* fue la más representativa con un total de 41 individuos encontrados en el municipio de Maní (Casanare) seguida de las especies *Dendropsophus padreluna* con 34 individuos (San

Antonio de Tequendama Cundinamarca) y *Leptodactylus colombiensis* con 30 individuos en los municipios de Santa María (Boyacá) y Chameza (Cundinamarca). Las especies con un mayor rango de distribución fueron *Hypsiboas crepitans* y *Rhinella marina* las cuales se encontraron en los municipios de Dorada (Caldas), Santa María (Boyacá), Maní (Casanare) y Valparaíso (Caquetá) respectivamente (Anexo5).

3.4.2 Diagnóstico y cuantificación de zoosporas de las especies positivas a la presencia del patógeno.

Ninguno de los anfibios muestreados presentaron signos aparentes de la enfermedad, sin embargo tres individuos de tres especies fueron positivos para la presencia de *B. dendrobatidis*, al observar amplificación de las muestras, mediante el diagnóstico molecular realizado, con valores de Ct mayores al estándar 10^0 . Estas especies, corresponden a la familia Leptodactylus (*Leptodactylus colombiensis* (1/30) e Hylidae (*Dendropsophus labialis* (1/9) y *Dendropsophus mathiassoni* (1/12)) (Anexo 5).

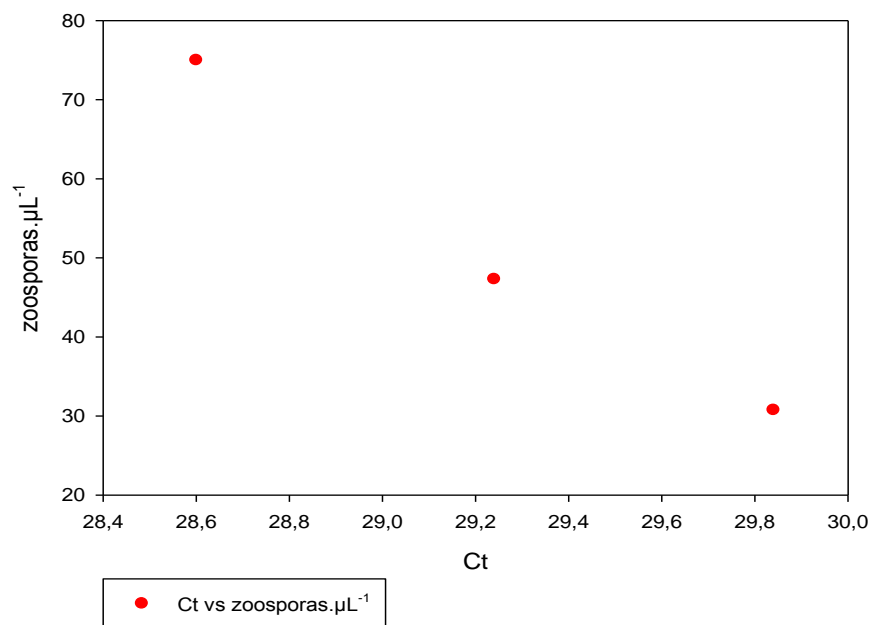


Figura 9. Concentración de zoosporas μL^{-1} de las muestras positivas.

La mayor concentración de zoosporas se presentó en la muestra S17 perteneciente a la especie *Leptodactylus colombiensis* (75 zoosporas· μL^{-1}) seguida de la muestra M5 y Sm(III)46 correspondientes a las especies *Dendropsophus labialis* (47 zoosporas· μL^{-1}) y *Dendropsophus mathiassoni* (31 zoosporas· μL^{-1}) respectivamente, como se observa en la Figura 9.

3.4.3 Variables ambientales asociadas a la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis*.

- **Altitud**

Los valores arrojados por la regresión logística binaria no fueron significativos ($P=0.609$), lo que indica que no existe una relación entre la altitud y la presencia de *B. dendrobatidis* (Anexo 6). Estos resultados se deben a la baja tasa de individuos que fueron diagnosticados como positivos, de igual manera con respecto a la concentración de zoosporas y la relación con la altitud tampoco fueron estadísticamente significativos ($P=0.435$) (Anexo 7). Las especies positivas se encontraron durante el muestreo en altitudes medias y altas, donde la mayor concentración de zoosporas (75 zoosporas· μL^{-1}) se detectó en la muestra S17 correspondiente a la especie *Leptodactylus colombiensis* la cual se hallaba a una altitud de 818 m. La segunda muestra con mayor concentración de zoosporas (47 zoosporas· μL^{-1}) fue la M5 la cual fue realizada a un individuo de la especie *Dendropsophus labialis* en una altitud de 2592 m. y por último se encuentra la especie *Dendropsophus mathiassoni* (SMIII(46)) la cual se muestreó a una altitud de 786 m, presentando la concentración más baja detectada (31 zoosporas· μL^{-1}) (Figura 10).

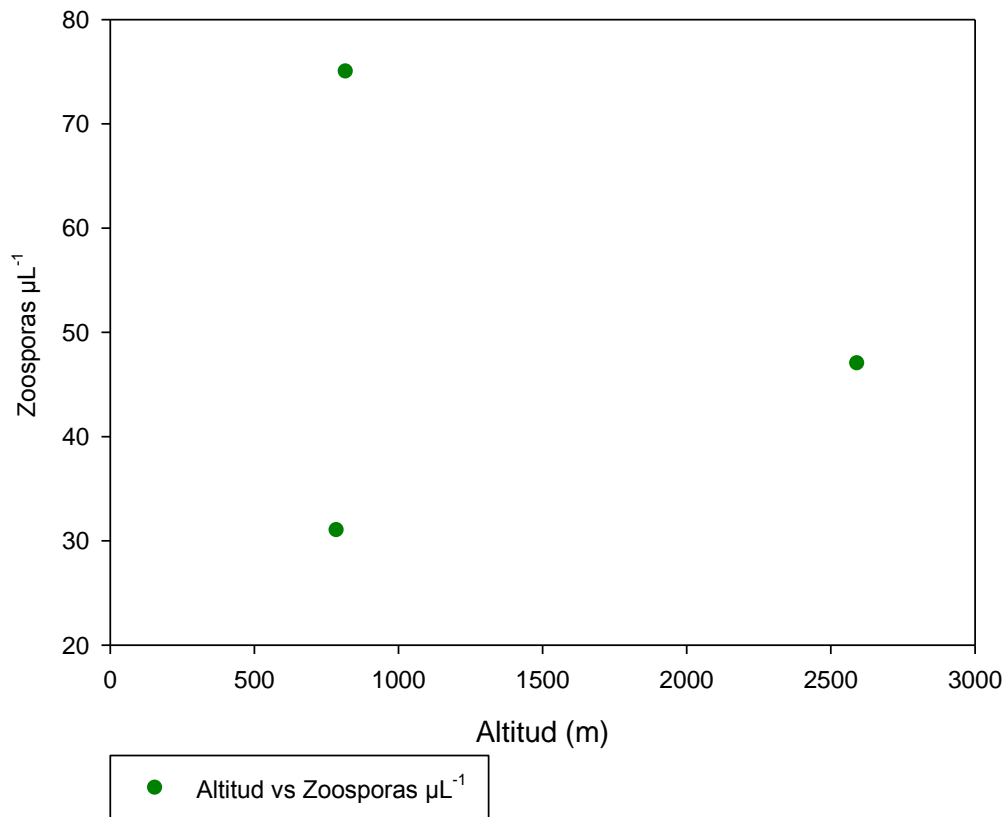


Figura 10. Relación de la concentración de zoosporas, μL^{-1} y Altitud

● Temperatura

A pesar que la temperatura es un factor clave para el desarrollo de *B. dendrobatidis*, el resultado obtenido no fue significativo con la presencia del patógeno ($P=0.162$) (Anexo 6), ni con la concentración de zoosporas de las muestras positivas ($P=0.97$) (Anexo 8), los resultados obtenidos indican que la mayor concentración (75 zoosporas· μL^{-1}) se encontró a una temperatura de 23.9°C la cual ha sido reportada como óptima para el desarrollo del patógeno (Piotrowski *et al.*, 2004), además las concentraciones más bajas (47 zoosporas· μL^{-1} y 31 zoosporas· μL^{-1}), se encontraron entre las temperaturas límite del crecimiento del hongo (25.5°C y 14°C) (Figura 11).

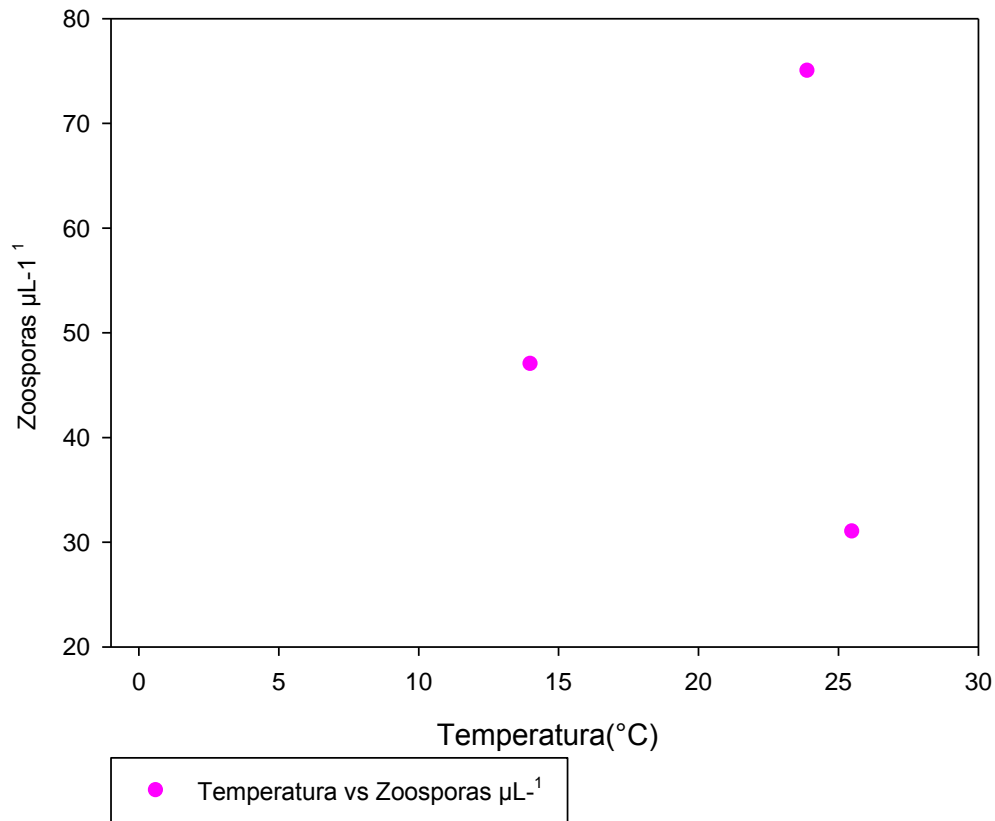


Figura 11. Relación de la concentración de zoosporas μL^{-1} y Temperatura

● **Humedad**

Al igual que las otras variables incluidas en el análisis estadístico, la humedad no presentó un vínculo con la presencia de *B. dendrobatidis* ($P= 0.868$) (Anexo 6) y tampoco con la concentración de zoosporas ($P= 0.958$) (Anexo 9), la mayor concentración ($75 \text{ zoosporas}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) se presentó cuando la humedad fue del 83.5%, mientras que la menor concentración ($31 \text{ zoosporas}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) se observó cuando el porcentaje de humedad fue del 87% (Figura 12).

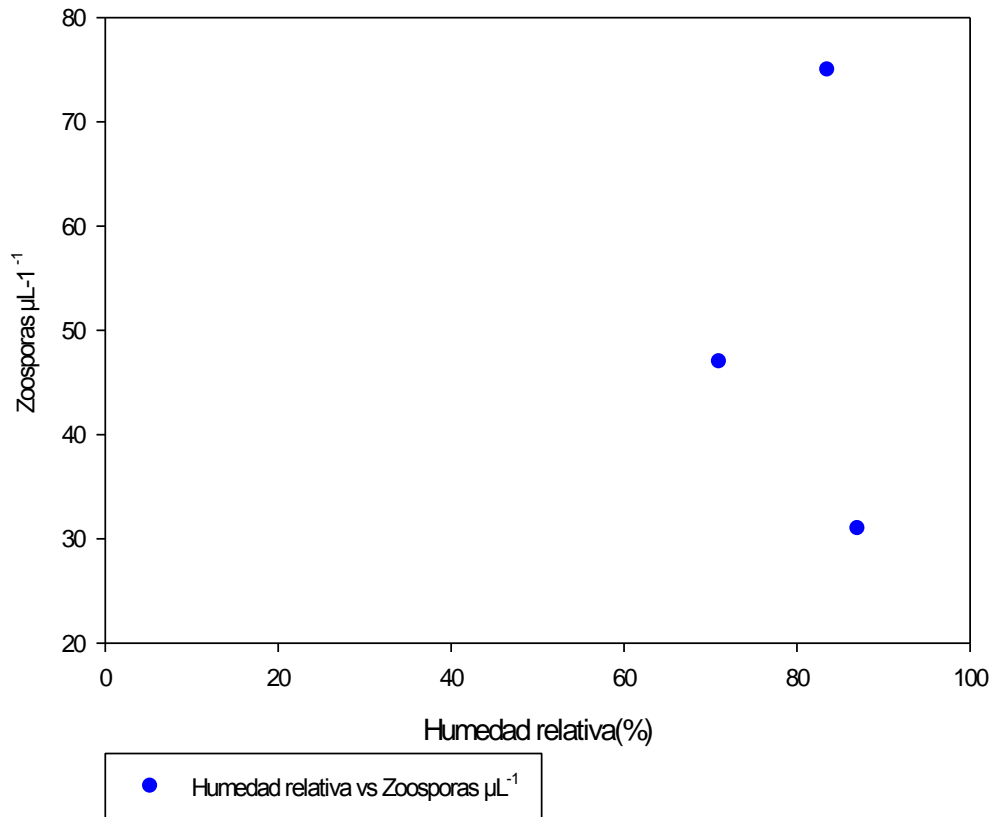


Figura 12. Relación de la concentración de zoosporas μL^{-1} y Humedad

4.5 Distribución del *Batrachochytrium dendrobatidis*

Las localidades que evidenciaron la presencia de *B. dendrobatidis* se encuentran ubicadas en la Cordillera Oriental, en los municipios de Santa María (Boyacá) (*Leptodactylus colombiensis* y *Dendropsophus mathiassoni*) y Madrid (Cundinamarca) (*Dendropsophus labialis*)

4.5.1 Características de Santa María Boyacá

Santa María es un municipio del Departamento de Boyacá, ubicada sobre la Cordillera Oriental en la parte media baja del piedemonte llanero, posee una altura de

850m, presenta una temperatura que oscila entre los 16°C y los 36°C y una humedad relativa del 83%. Está conformado por bosques premontanos húmedos, con alturas entre 400m y 2600m, las microcuencas (Río Batá, Guavio, Tunjita, Lengupa y Bocachico) pertenecen al río Orinoco, presenta un relieve escarpado y erosionado en diferentes grados. El municipio cuenta con una riqueza en flora principalmente en especies maderables, ornamentales, industriales, medicinales y artesanales, presenta una estrecha relación faunística con las especies del Pie de Monte Llanero por su cercanía, la cual se encuentra actualmente amenazada por la expansión agropecuaria, la caza indiscriminada y la destrucción de su hábitat (<http://santamaria-boyaca.gov.co/index.shtml>) (Figura 13).

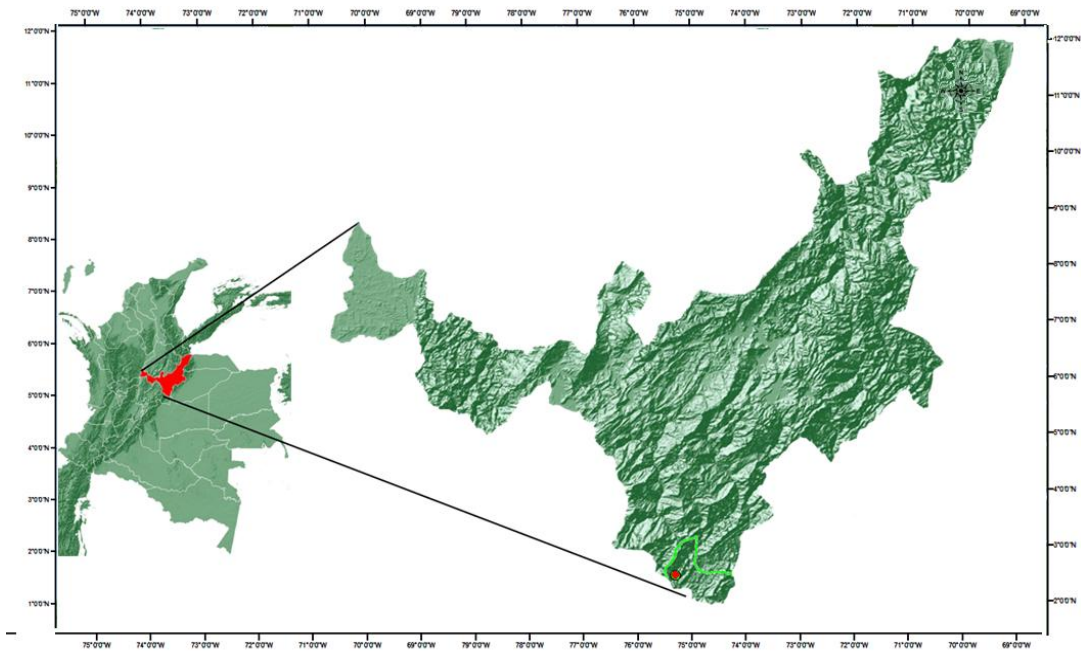


Figura 13. Localización del Municipio de Santa María Boyacá.

Las localidades positivas de esta región presentaron las siguientes características:

- **Quebrada las Vueltas**

La Quebrada de las Vueltas forma parte del río la Libertad, se encuentra ubicada en el área urbana del municipio a una latitud Norte de 4° 51' 30.5" y una longitud Oeste 73° 15' 56.8", una altitud 818m. Presenta un caudal permanente que está rodeado de

abundante vegetación herbácea y leñosa, además existen contaminantes como residuos sólidos principalmente plásticos.

- **Río Batá**

El Río Batá es un receptor de las aguas servidas del alcantarillado municipal de las quebradas, La Argentina, El Toro y Caño Cangrejo, a una latitud Norte de $4^{\circ} 50' 53.7''$ y una longitud Oeste $73^{\circ} 16' 20.7''$, una altitud de 786m. Es una micro-cuenca del río Orinoco, presenta un cauce de aguas rápida con corrientes fuertes, su vegetación es abundante principalmente herbácea y leñosa.

4.5.2 Características de Madrid Cundinamarca.

El municipio de Madrid (Cundinamarca) tiene una extensión de 120.5Km^2 , una altitud de 2554 m y una temperatura promedio de 14°C . Posee reservas naturales como el Valle de Abra que se encuentra ubicado al noreste y microcuencas del Río Frío, como el Río Subachoque, el cual abastece la planta de tratamiento de agua del municipio y la Laguna de la Herrera que hace parte de la cuenca hidrográfica del Río Bojacá (<http://madrid-cundinamarca.gov.co/index.shtml>) (Figura 14).

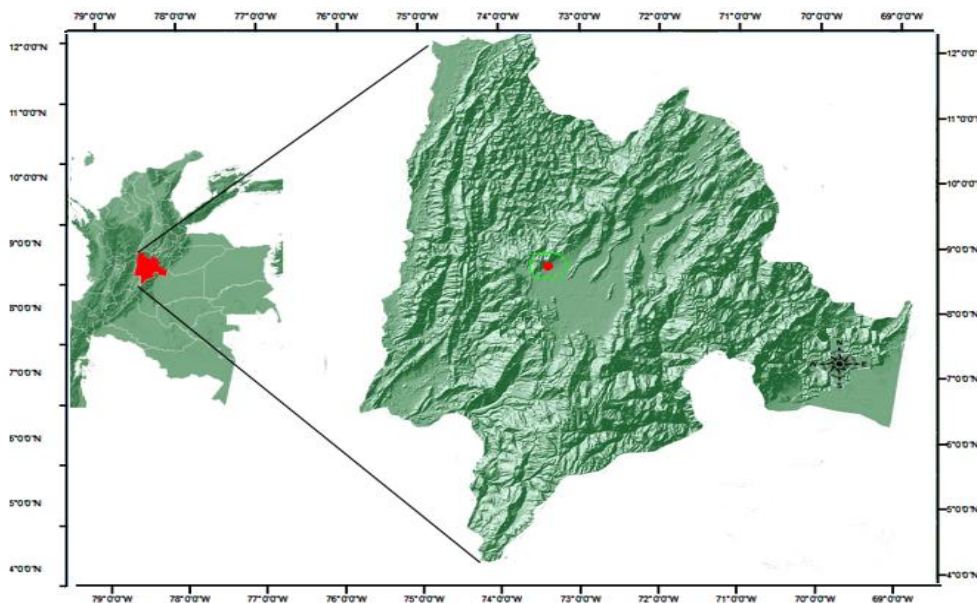


Figura 14. Localización del Municipio de Madrid Cundinamarca.

Las características principales de la localidad positiva fueron:

- **Finca Altagracia**

La finca Altagracia es un hato lechero que se ubica en latitud Norte 4° 47' 50.5" y longitud Oeste 74° 15' 57.1", una altitud de 2592m y presenta áreas boscosas con vegetación nativa, adicionalmente posee un cuerpo de agua natural permanente.

A continuación se referencian geográficamente las localidades positivas para la presencia de *B. dendrobatidis* (amarillo) incluyendo las referenciadas por Ruiz y Rueda-Almonacid (2008), Velásquez y colaboradores (2008) y Quintero (2008) (rojo) (Figura 15).

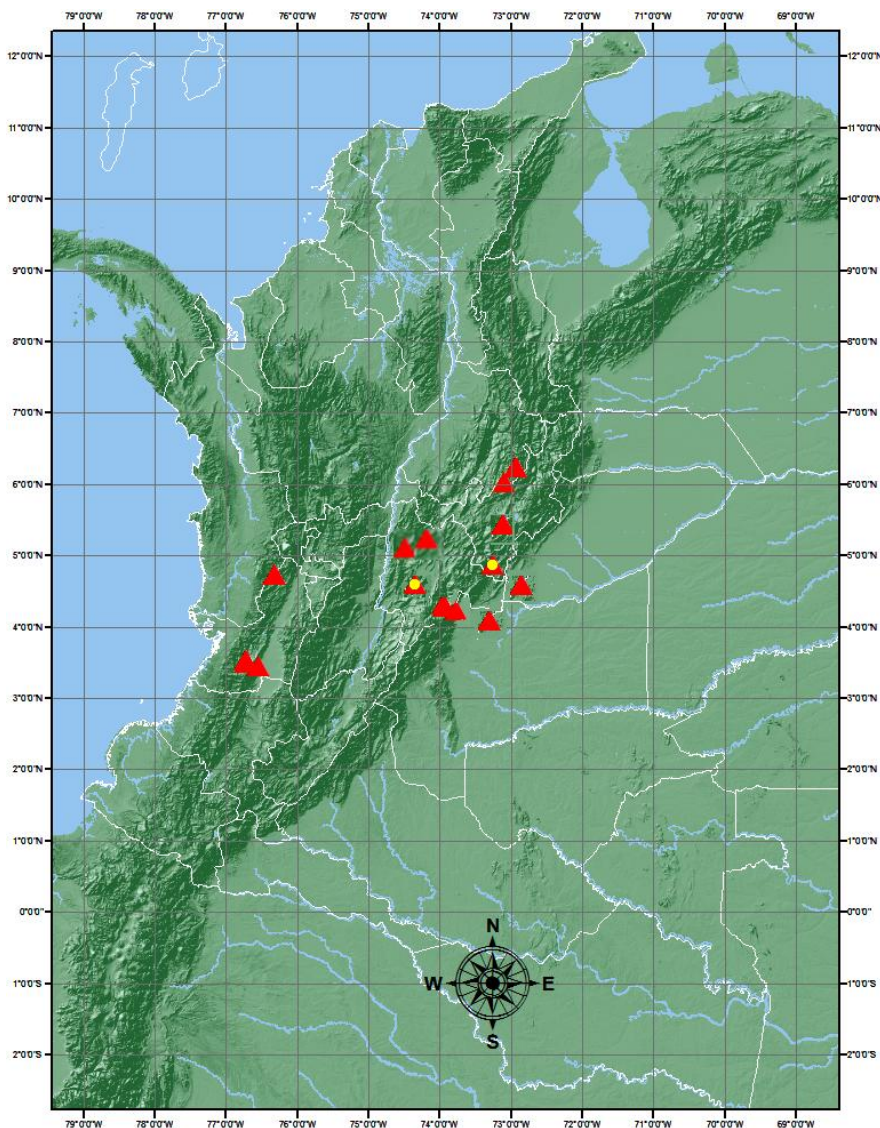


Figura 15. Mapa de distribución de *Batrachochytrium dendrobatidis*

4.6 Ensayo inhibitorio

4.6.1 Curva de crecimiento de *Janthinobacterium lividum*

Los datos obtenidos por densidad óptica, recuento de células totales en cámara de Neubauer y siembra en placa para recuento de células viables, permitieron construir la curva de crecimiento de la bacteria con el fin de identificar la fase estacionaria donde se origina la producción de metabolitos secundarios (violaceína y 3-indol-carboxialdehído) y poder realizar el ensayo inhibitorio (Anexo10).

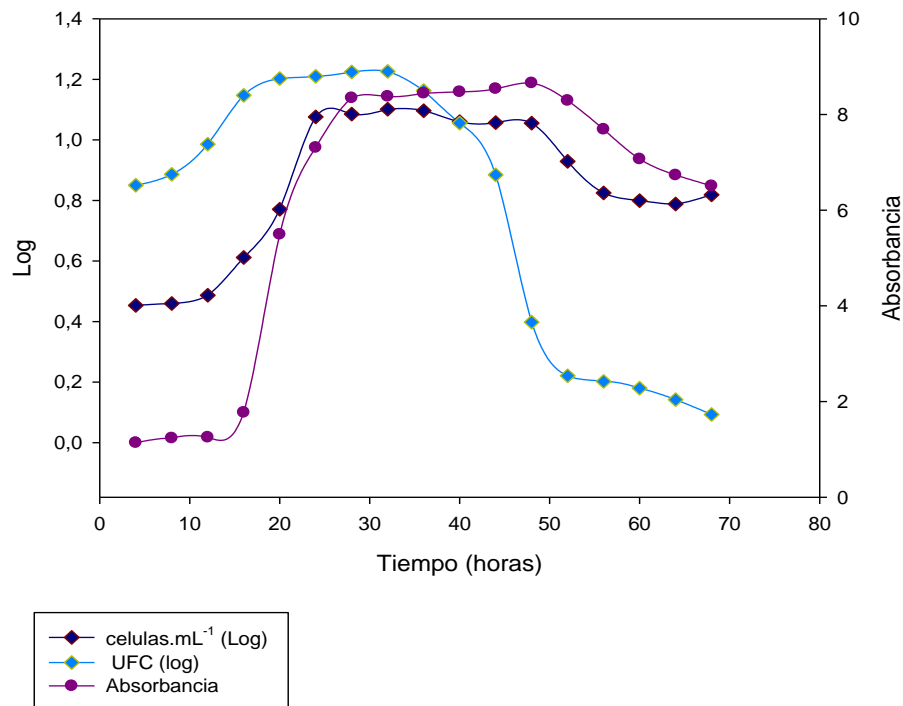


Figura 16. Curva de crecimiento de *Janthinobacterium lividum*

Los resultados del crecimiento de *Janthinobacterium lividum* en medio triptona al 1%, se muestran en la figura 16, donde se observa un periodo de adaptación celular durante las primeras 12 horas, posteriormente se inicia la fase logarítmica hasta la hora 20 para células viables y 28 para células totales, donde comienza la fase estacionaria; en la células viables a la hora 36 se da el inicio a la fase de muerte, mientras que para células totales a la hora 52 se observa el decrecimiento de la biomasa.

4.6.2 Antagonismo de *Janthinobacterium lividum*

En los resultados obtenidos de la prueba de antagonismo por difusión de metabolito en pozo, en la figura 17 se puede observar que tras ocho días de incubación, se presenta la formación de halos de inhibición en las dos horas evaluadas (36 y 52 de incubación de la bacteria), adicionalmente al realizar la siembra del hongo y la ubicación de la bacteria en los pozos al mismo tiempo, *J. lividum* se distribuyó en

toda la caja de petri impidiendo el desarrollo y el crecimiento del hongo *B. dendrobatidis* (Figura 17 C).

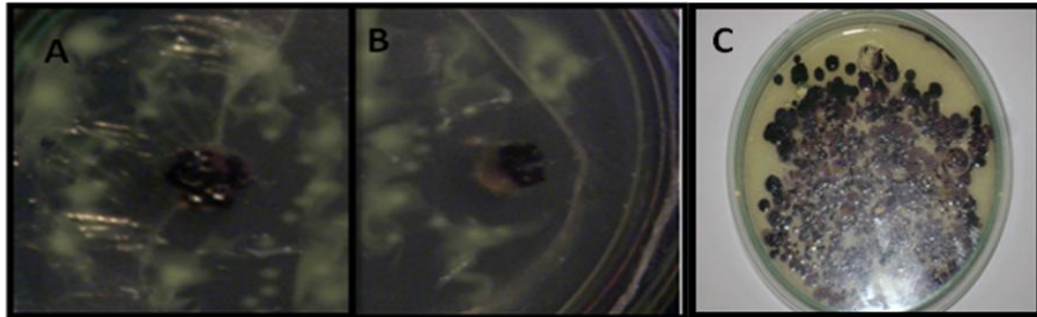


Figura 17. Evaluación del antagonismo de *Janthinobacterium lividum* sobre el crecimiento de *Batrachochytrium dendrobatidis* por difusión de metabolito en pozo. (A) Bacteria a la hora 36 de incubación. (B) Bacteria a la hora 52 de incubación. (C) Siembra a tiempo del hongo y la bacteria.

En la prueba de antagonismo se observa que a la hora 36 de incubación de la bacteria se formó un halo de inhibición aproximadamente de 5mm de diámetro, y a la hora 52 se observa una inhibición de *B. dendrobatidis* alrededor de los pozos con un halo de aproximadamente de 18 mm (Anexo11).

5. DISCUSIÓN

Con respecto al número de individuos analizados, una de las familias importantes fue la Strabomantidae (23%). En esta familia se encuentran las especies del género *Pristimantis* (*P. altamazonicus*, *P. carlossanchezi*, *P. elegans*, *P. frater*, *P. lanthanites*, *P. medemi*, *P. savagei*, *P. taeniatus*, *P. gaigei*, *P. miyatai*, *P. susaguae*, *P. renjiformum*) las cuales fueron negativas para la presencia de *B. dendrobatidis* a diferencia de lo referenciado por Velásquez y colaboradores (2008) y Quintero (2008), donde evidenciaron especies de este género positivas a la presencia del patógeno. La familia Bufonidae no fue tan representativo en cuanto al número de individuos encontrados, especies pertenecientes a este género han sido relacionadas con el declive poblacional de anfibios, y con una alta patogenicidad a *B. dendrobatidis* (Berger *et al.*, 1998; Bonaccorso *et al.*, 2003; Lips *et al.*, 2008; Lampo y Barrio 2007). La especie *Atelopus mittermeieri*, muestreada en el Santuario de Fauna y Flora de Guanentá (Santander), fue negativa en esta investigación; este resultado difiere de los datos obtenidos por Ruiz y Rueda-Almonacid (2008), quienes por análisis histológico detectaron a *B. dendrobatidis* de una especie perteneciente al Museo de Historia Natural de la Pontificia Universidad Javeriana, el cual fue colectado en esta misma zona.

Basándose en estos resultados se puede pensar que estas poblaciones se han recuperado o estabilizado después del contagio con la enfermedad, resultados similares fueron descritos por Retallick y colaboradores (2004) donde observaron una recuperación de la especie *Taudactylus eungellensis* después de haberse declarado extinta en Australia por la quitridiomicosis.

Los géneros que fueron positivos a la presencia de *B. dendrobatidis* ya han sido reportados a nivel mundial con un alto número de especies infectadas. La familia Leptodactylidae fue reportado por primera vez en Sur América (Argentina) por Herrera y colaboradores (2005), en la especie *Leptodactylus ocellatus* donde 4 individuos fueron positivos a la enfermedad. Posteriormente en Brasil, Toledo y

colaboradores (2006a), por análisis histológicos y moleculares, confirmaron la presencia de *B. dendrobatidis* en la especie *Hylodes magalhaesi* la cual pertenece a esta familia; además en otro estudio realizado por Toledo y colaboradores, (2006b) en este mismo año, evidenciaron que renacuajos de las especies *Leptodactylus labyrinthicus*, *Leptodactylus chaquensis* y *Leptodactylus podicipinus* eran portadores del patógeno. En Asia, Une y colaboradores (2008) presentaron el primer reporte de quitridiomycosis para Japón en un estudio que incluía a la especie *Leptodactylus pentadactylus*. McCracken y colaboradores (2009) reportaron las especies *Leptodactylus discodactylus* (2/5), *Leptodactylus pentadactylus* (4/5) y *Leptodactylus rhodomystax* (1/1) en un estudio realizado en la selva amazónica ecuatoriana. En cuanto a la familia Hylidae fue diagnosticado *B. dendrobatidis*, en el primer estudio a nivel mundial de quitridiomycosis realizado por Berger y colaboradores (1998) en Australia, a partir de anfibios muertos en los bosques de Queensland y Panamá, donde se incluyeron 5 especies pertenecientes a esta familia *Litoria rheocola*, *L. nannotis*, *L. lesueuri*, *L. caerulea*, *L. spenceri*. Carnaval y colaboradores (2006) examinaron 96 ejemplares de colección pertenecientes a los bosques de Brasil, donde 5 especies fueron positivas entre las que se encontraron 2 renacuajos de *Hypsiboas freicanecae*. En este mismo año, Toledo y colaboradores (2006b), analizaron 41 renacuajos de 28 especies donde 8 ejemplares positivos pertenecieron a la familia, *Aplastodiscus callipygius*, *A. cf. leucopygius*, *Bokermannohyla hylax*, *B. circumdata*, *Hypsiboas albopunctatus*, *H. semilineatus*, *Phrynomedusa cf. marginata*, *Scinax albicans*. Felger y colaboradores (2007) diagnosticaron por primera vez la quitridiomycosis en Honduras, mediante análisis histológico, siendo positiva la especie *Agalychnis moreletii*. En el 2008, Sánchez y colaboradores, en un estudio realizado en los Andes Venezolanos específicamente en la cordillera de Mérida, especies como *Dendropsophus meridensis*, *Hyloscirtus jahni*, *Scarthyla vigilans* e *Hypsiboas crepitans* fueron positivas a la enfermedad.

Los resultados obtenidos en la curva estándar se encuentran por encima de los mínimos requeridos para una cuantificación confiable ya que se recomienda una eficiencia de amplificación aceptable del 92%, la cual corresponde a una pendiente de

-3.55 y un coeficiente de correlación del 0.98 (Rodríguez y Rodríguez 2006; Pinilla *et al.*, 2008). En cuanto a la sensibilidad los valores reportados por Boyle y colaboradores (2004) y Hyatt y colaboradores (2007), en los protocolos de amplificación para la detección del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* por PCR en tiempo real, indican que el valor debe ser de 0.1 equivalente zoospora, autores como Pinilla y colaboradores (2008) indican que pendientes con valores más positivos a -3.32 se debe a problemas de calidad de la muestra patrón, por lo cual al obtener una pendiente de -3.203 podríamos inferir que el ADN del estándar pudo ser degradado debido a condiciones de almacenamiento durante el transporte desde Australia. Esta curva patrón es óptima para cuantificar la concentración del patógeno en los anfibios muestreados, permitiendo obtener valores confiables en muestras con bajas cantidades de zoosporas.

Las bajas concentraciones de zoosporas detectadas en las especies positivas (*Leptodactylus colombiensis*, *Dendropsophus labialis* y *Dendropsophus mathiasson*), explican el hecho de que los ejemplares fueran asintomáticos y que no se encontraran muertes masivas durante los muestreos, ya que una carga de zoosporas mayor a 10^4 es letal para los anfibios (Briggs *et al.*, 2010). Las posibles causas de estos resultados es que los ejemplares se encontraban 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). Otra circunstancia puede ser la presencia de diversos factores de virulencia del hongo *B. dendrobatidis*, como lo demostró Berger y colaboradores (2005b), en un estudio realizado en la especie *Litoria caerulea*, donde los anfibios fueron expuestos a tres cepas de *B. dendrobatidis* de diferentes regiones de Australia, observando variaciones en ellas en cuanto a su comportamiento y grados de infección; de igual manera Voyles (2011) determinó que la producción de esporangios y zoosporas variaba significativamente entre aislamientos a pesar de la baja variabilidad genética descrita por Morehouse y colaboradores (2003) y Morgan y colaboradores (2007).

Adicionalmente muchos anfibios de estos géneros poseen péptidos asociados a su sistema inmunológico como mecanismo de defensa a diversas enfermedades (Rollins-

Smith y Conlon 2005; Conlon *et al.*, 2009a). De la familia Leptodactylidae solo un péptido ha sido enfrentado a *B. dendrobatidis* el cual es conocido como Fallaxin que evidenció una baja actividad antifúngica (Rollins-Smith y Conlon 2005), pero otros péptidos han demostrado una alta eficiencia contra otro tipo de microorganismos. El Pentadactylin es extraído de la especie *Leptodactylus pentadactylus*, tiene la capacidad de inhibir bacterias Gram-negativas, Gram positivas y algunos hongos con concentraciones mínimas inhibitorias que van desde 25µM para *Escherichia coli* hasta 200 µM para *Candida albicans* (King *et al.*, 2005) o el syphaxin (SXP) proveniente de la especie *Leptodactylus syphax* que ha sido evaluado frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Dourado *et al.*, 2007). Otros péptidos que se han estudiado son los pertenecientes a las especies *Leptodactylus validus* y *Leptodactylus laticeps* cuya actividad antagónica frente a algunos microorganismos no fue tan satisfactoria (King *et al.*, 2008; Conlon *et al.*, 2009b). En cuanto a la familia Hylidae los primeros péptidos estudiados fueron identificados en 12 especies que no presentaron declive en Australia (*Litoria aurea*, *L. raniformis*, *L. caerulea*, *L. splendida*, *L. gilleni*, *L. ewingi*, *L. chloris*, *L. citropa*, *L. dahlia*, *L. infrafrenata*, *L. genimaculata*, *L. rubella*), de los 10 péptidos extraídos tres (caerin 1.9, caerin 1.1, y maculatin) presentaron un mayor potencial inhibitorio frente a *B. dendrobatidis*, los demás generaron resultados óptimos (Woodhams *et al.*, 2006a; Woodhams *et al.*, 2007). En Panamá se analizaron dos especies, entre la que se encontraba *Phyllomedusa lemur*, donde demostraron que la presencia de péptidos confería cierta resistencia a *B. dendrobatidis*; el Dermaseptin-L1 y el Phylloseptin-L1, los cuales fueron identificados en esta especie e inhiben el crecimiento de las zoosporas en concentraciones superiores a 25µM (Woodhams *et al.*, 2006b; Conlon *et al.*, 2007). Por otra parte los anfibios por poseer una piel desnuda se encuentran expuestos a microorganismos ambientales que les confiere, en muchas ocasiones protección contra patógenos, mediante relaciones simbiotes mutualistas con el hospedero (Brucker *et al.*, 2008b). La mayoría de investigaciones se han realizado con la microflora de la salamandra *Plethodon cinereus* y de la *Rana muscosa*, donde se han descrito bacterias como *Lysobacter gummosus* y *Janthinobacterium lividum* las cuales poseen metabolitos antifúngicos como el 2,4-diacetylphloroglucinol, el

indol-3-carboxialdehído y la violaceína (Brucker *et al.*, 2008a; Brucker *et al.*, 2008b). Estos microorganismos se han descrito como habitantes cosmopolitas del suelo y el agua (Pantanella *et al.*, 2007) por lo que no se descarta que anfibios pertenecientes a las familias Leptodactylidae e Hylidae, utilicen estas bacterias para su protección. Estudios realizados con anterioridad en la Pontificia Universidad Javeriana por Ramírez en el 2010, para referir la flora acompañante de las especies muestreadas, se logró identificar a *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue reportado como antagonista de *B. dendrobatidis* por Harris y colaboradores (2006). Resultados similares a la baja carga de zoosporas también fue evidenciada en la provincia de Yunnan de China, donde Bai y colaboradores (2010) determinaron concentraciones aproximadamente de 598.3 equivalente genómico, adicionalmente en el 2011, Swei y colaboradores, 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 10.000 zoosporas (Briggs *et al.*, 2010).

Las especies diagnosticadas positivas, están relacionadas con cuerpos de agua en cuanto a su modo reproductivo, ya que *Dendropsophus labialis* y *Dendropsophus mathiasson* presentan modo de reproducción tipo 1, donde sus huevos son depositados en zanjas, charcos, pantanos, estanques, lagos y arroyos y su desarrollo larval se realiza en estos cuerpos de agua, mientras que la especie *Leptodactylus colombiensis* a pesar que es una especie terrestre, presenta modo tipo 5, donde los huevos son depositados en nidos de espuma y los renacuajos culminan su proceso metamórfico libremente en el agua (Crump 1974). Estas características las hace vulnerables y asequibles al contagio con *B. dendrobatidis*, debido a que parte de su ciclo de vida se realiza en medio acuático dispersándose hasta hallar un hospedero (Berger *et al.*, 2005a). Woodhams y Alford (2005), Kriger y colaboradores (2007), Rowley y colaboradores (2007) concuerdan en que las especies de anfibios asociados a cuerpos de agua tienen más probabilidad de ser contagiados, y adicionalmente ser potenciales reservorios de la enfermedad, ya que pueden infectar a otros individuos que entran en contacto con los cuerpos de agua y a las larvas que están en proceso

metamórfico, así como a sus congéneres durante la etapa de apareamiento en momento del amplexo. Así mismo Crump (2003) en un capítulo del libro “Amphibian Conservation” determinó que las especies de estos modos reproductivos son las más implicadas en el declive.

Aunque las especies positivas se encontraron en rangos altitudinales medios y altos, los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico han sido evidenciados en diversos estudios de detección. Drew y colaboradores (2006) realizaron un análisis de las condiciones ambientales con respecto a la presencia de *B. dendrobatidis* en 56 sitios de la costa de Australia, donde determinaron que no existe una relación significativa entre la altitud y la presencia de la quitridiomycosis. Por otra parte Kriger y colaboradores (2007), publicaron a partir de una investigación realizada en este mismo país, ejecutando muestreos en altitudes desde 90 hasta 885m, que no hay pruebas consistentes de que la infección y la concentración de zoosporas dependan de la altitud. Puschendorf y colaboradores (2006a) examinaron 220 especímenes pertenecientes a 32 especies en 7 zonas de Costa Rica, que comprendían altitudes de 300m, 700m, 1000m, 1500m, 1800m, 2050m, y 2600m, observando que la infección se presentó en todas las altitudes. Quintero (2008) concluyó durante una exploración en el noreste de la cordillera Oriental de los Andes Colombianos, que no hay una asociación entre esta variable y la enfermedad. Además, *B. dendrobatidis* se ha detectado desde el nivel del mar como en la isla de Hawai (Beard y O'Neill 2005) hasta regiones de los Alpes Peruanos con altitudes de 5348m (Seimon *et al.*, 2007). Sin embargo Pounds y colaboradores (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 y colaboradores (2008) vinculan la altitud con la concentración de zoosporas y la prevalencia de la enfermedad en la cordillera de Mérida en Venezuela, siendo escasos los datos reportados a nivel del trópico.

Los anfibios positivos a la presencia del patógeno se encontraron dentro de las temperaturas óptimas de crecimiento del hongo. Estudios *in vitro* realizados por

Piotrowski y colaboradores (2004) determinaron, que *B. dendrobatidis* posee un amplio rango de crecimiento (17-25°C) reproduciéndose rápidamente a los 23°C; temperatura a la cual se detectó la mayor concentración de zoosporas (75 zoosporas· μL^{-1}). Berger y colaboradores (2004) estudiaron los efectos de la temperatura en el desarrollo de la quitridiomycosis concluyendo que la transmisión se da en diferentes valores, observando una mayor mortalidad en los anfibios expuestos a condiciones entre los 17°C y los 23°C. Muchos autores informan que temperaturas mayores a 25°C pueden ser letales para el patógeno (Piotrowski *et al.*, 2004), sin embargo se diagnosticó la presencia de *B.d.* en temperaturas de 25.5°C aunque con una baja carga de zoosporas (31 zoosporas· μL^{-1}). Berger y colaboradores (2004) reportan que a pesar que *B. dendrobatidis* crece más fácilmente a bajas temperaturas, también puede desarrollarse a temperaturas de 27°C. Woodhams y colaboradores (2008) indican que los aumentos de temperaturas en el medio ambiente incrementan el crecimiento del hongo inclusive en rangos superiores a la temperatura óptima (23°C), además explica que a bajas temperaturas (10°C) los zoosporangios maduran más lento produciendo una mayor concentración de zoosporas, lo cual explica que se haya encontrado un individuo infectado a una temperatura de 14°C.

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 ser porque durante los años del muestreo (2009-2010) se presentaron variaciones climáticas en el país, ya que los reportes del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia (IDEAM) informaron que en estas temporadas, se evidenció el fenómeno del niño en 2009, ocasionando grandes sequías en la zona Andina y el fenómeno de la niña en el 2010, desencadenando inundaciones como consecuencia del aumento de las precipitaciones, estos factores pudieron afectar la condiciones propicias de proliferación de *B. dendrobatidis*, discrepando con lo descrito por Pounds y colaboradores (2006) quienes relacionan el fenómeno del niño con el incremento de enfermedades infecciosas; su hipótesis propone que el aumento de nubosidad favorece el crecimiento del hongo, su supervivencia y reproducción. En los resultados obtenidos durante el año 2009, solo la especie *Leptodactylus*

colombiensis fue positiva a la presencia del patógeno, además su carga fúngica fue la más alta ($75 \text{ zoosporas} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) en comparación con los otros individuos, muestreados en el 2010

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 Woodhams y Alford (2005), quienes reportan que el patógeno puede tener temperaturas y precipitaciones limitadas pero altas condiciones de humedad. Drew y colaboradores (2006) sugieren que los anfibios expuestos a humedad desarrollan más fácilmente la quitridiomycosis que aquellos expuestos a lluvias continuas. Lips y colaboradores (2008) dicen que la combinación de variables ambientales incluyendo la humedad influye en el crecimiento y ecología de *B. dendrobatidis*.

Al igual que la temperatura, la humedad es un factor asociado a las variaciones climáticas presentadas durante los años 2009-2010 (fenómeno de niño y fenómeno de la niña). Estas anomalías hidro-climáticas afectan los vientos alisios alterando el transporte de vapor, variando la humedad relativa (IDEAM 2009-2010), esto permite suponer que las condiciones de humedad no fueron las adecuadas para el desarrollo óptimo de *B. dendrobatidis* lo cual se vio reflejado en bajo número de individuos diagnosticados y las concentraciones detectadas.

Estos resultados aportan información sobre la distribución del patógeno en el país evidenciando la susceptibilidad de las especies en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Ruiz y Rueda-Almonacid (2008) detectaron el patógeno en especies pertenecientes a estos departamentos en altitudes medias y altas. Quintero (2008) reportó 4 localidades positivas para la presencia de *B. dendrobatidis* en el departamento de Cundinamarca y una en el departamento de Boyacá. Además, Ron (2005), en el modelo de predicción para el nuevo mundo sobre la distribución de *B. dendrobatidis*, sugiere que la región Andina es más susceptible ya que presenta una mayor riqueza y endemismo de especies con respecto a otras zonas del país como la Orinoquia. Lips y colaboradores (2008) sugieren que la quitridiomycosis se ha

extendido desde Venezuela hacia los Andes Colombianos a través de las Cordilleras Occidental, Central y Oriental. Es necesario realizar estudios de detección en otras zonas, así como de incidencia y prevalencia en las localidades reportadas: Santa María (Boyacá) y Madrid (Cundinamarca), que permitan determinar el estado poblacional de las especies endémicas y el comportamiento de *B. dendrobatidis* en el país.

En cuanto a la prueba realizada por difusión de metabolito en pozo, se observa que la inhibición de *B. dendrobatidis* fue dada por la presencia de los metabolitos secundarios de *Janthinobacterium lividum*, ya que la formación de los halos de inhibición demuestran que estos compuestos afectan el desarrollo del patógeno impidiendo su crecimiento. Brucker y colaboradores (2008b) identificaron que los compuestos químicos antifúngicos asociados a la bacteria eran el 3-indol-carboxialdehído y la violaceína, cuyas propiedades otorgaban resistencia en las salamandras *Plethodon cinereus* a la presencia de *B. dendrobatidis*. Brecker y colaboradores (2009) sugirieron que concentraciones de violaceína cercanas a 18 μM prevenían a las salamandras *Plethodon cinereus* de la mortalidad causada por el hongo *B.d.* Adicionalmente estudios realizados por Harris y colaboradores (2009) en *Rana muscosa* demostraron que anfibios expuestos a *B. dendrobatidis* y a *J. lividum* sobrevivieron sin desarrollar efectos letales.

La inhibición se presentó en los dos periodos (tiempos) evaluados del crecimiento de la bacteria (36 y 52 horas) esto se debe a que la formación de los metabolitos secundarios se realiza después de la fase de crecimiento, autores como Pantanella y colaboradores (2007) reportan que la producción del pigmento se inicia durante la fase de crecimiento y alcanza su máxima concentración durante la fase de muerte de la célula. Lu y colaboradores (2009) sugieren que la violaceína es un metabolito secundario ya que su formación se origina en la fase estacionaria (2 días).

La mayor inhibición se dio a la hora 52 debido a diversas circunstancias, una de ellas es el aumento poblacional de la bacteria, este factor es importante en el desarrollo de los metabolitos, debido a que *J. lividum* forma violaceína y biopelículas mediante

mecanismos de Quorum sensing (Pantarella *et al.*, 2007). Estos factores pueden conferir resistencia y protección a los anfibios contra *B. dendrobatidis* debido a que los compuestos anti-microbianos afectan al hongo haciéndolo menos competitivo, y la formación de biopelículas facilitan la supervivencia de la bacteria confiriéndole resistencia a los factores ambientales (Parsek y Greenberg 2005), además se ha demostrado que algunas bacterias pueden generar biopelículas en tejidos como estrategia invasiva (Sánchez *et al.*, 2010), por lo cual se podría inferir que *Janthinobacterium lividum* aparte de formar metabolitos antifúngicos puede formar biopelículas en la epidermis de los anfibios evitando el desarrollo de *B. dendrobatidis* restringiendo su colonización.

Otro factor importante son las interacciones biológicas como el amensalismo entre estos dos microorganismos, donde *B. dendrobatidis* se ve perjudicado debido al efecto microbiostático generado por *J. lividum* con la producción de la violaceína y el 3-indol-carboxialdehído. La acción de *J. lividum* ha sido demostrada contra otros microorganismos patógenos como el hongo *Itersonilia* sp., donde se reportó una inhibición micelial del 62% al realizar la prueba de antagonismo por enfrentamiento dual y halos de inhibición de 15mm de diámetro mediante prueba de Gauze (González 2010). Adicionalmente se ha propuesto la formación de una relación simbiote entre la bacteria y algunos anfibios como la salamandra *Plethodon cinereus*, lo cual beneficia a ambas especies ya que la bacteria confiere protección contra el patógeno y la salamandra aporta los recursos adecuados para el desarrollo de la misma (Brucker *et al.*, 2008b). Estas interacciones mutualistas se ha observado en otros organismos como la relación entre *Alteromonas* sp. y el camarón *Palaemon macrodactylus*, donde la bacteria produce antibióticos que protegen a los embriones de la acción patógena de hongo *Lagenidium callinectes* (Demain y Fang 2000). Además se debe tener en cuenta la competencia por nutrientes y espacio debido a la rápida colonización de *J. lividum*, como se demostró en el ensayo donde se sembró el hongo y la bacteria al mismo tiempo. Este microorganismo tiene una gran velocidad de crecimiento y un amplio rango de temperatura (2°C - 32°C) (Gillis y De Ley

2006), lo que permite su fácil desarrollo y un mayor incremento poblacional que restringe el espacio para el crecimiento de *B. dendrobatidis*.

6. CONCLUSIONES

- Las condiciones obtenidas durante la optimización de la PCR en tiempo real permitieron la detección de *B. dendrobatidis* en poblaciones de anfibios silvestres por lo cual pueden ser utilizadas en estudios posteriores donde se utilice termociclador Light Cycler 1.5 de Roche®.
- Las concentraciones de zoosporas detectadas en los anfibios diagnosticados como positivos fueron bajas, ya que los valores se encontraron por debajo de 10^2 zoosporas μL^{-1} .
- Existen condiciones ambientales y variables climáticas que no se tuvieron en cuenta durante el estudio, que pueden influir en el comportamiento de *B. dendrobatidis* (pH, turbidez, fenómeno del niño y fenómeno de la niña entre otras) ya que las tomadas durante el muestreo no están relacionadas con la presencia del patógeno ni con la concentración de zoosporas.
- Se diagnosticó molecularmente la presencia *B. dendrobatidis* en tres nuevas localidades de la Región Andina Oriental que incluyeron los municipios de Santa María (Boyacá) y Madrid (Cundinamarca), aportando nuevos registros que permiten complementar la distribución del patógeno en el país y evidencian la susceptibilidad de las especies de estas regiones frente a *B. dendrobatidis*.
- El hongo *B. dendrobatidis* (aislamiento colombiano) es inhibido por la bacteria *Janthinobacterium lividum* a nivel *in-vitro* lo que demuestra la protección que confiere la flora acompañante a algunos anfibios frente al patógeno.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de prevalencia e incidencia mediante el método de captura, re-captura utilizando microchip para determinar el estado de las poblaciones andinas de anfibios.
- Realizar análisis en zonas de la Cordillera Central con el fin de diagnosticar a *B. dendrobatidis* en esta región.
- Utilizar controles internos en la PCR en tiempo real que permitan detectar inhibidores que se puedan encontrar en las muestras.
- Estudiar la microflora de las especies de anfibios nativos que permitan identificar posibles antagonistas de *B. dendrobatidis*.
- Identificar la presencia de péptidos antifúngicos que puedan inhibir el crecimiento de *B. dendrobatidis* en las comunidades de anfibios del país.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Galvis AR. Ranas, salamandras y caecilias (Tetrapoda: Amphibia) de Colombia. *Biota Colombiana* 2000; **1** (3):289-319.
- Acosta-Galvis AR, Rueda JV, Velásquez A A, Sanchez SJ, Peña JA. Descubrimiento de una nueva especie de *Atelophus* (Bufonidae) para Colombia: ¿una luz de esperanza o el ocaso de los sapos arlequines? *Revista Académica Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 2006; **30** (115):279-290.
- Acosta-Galvis AR. Comunicación personal, Abril 15 de 2010.
- Alexander MA, Eischeid JK. Climate variability in regions of amphibian declines. *Conservation Biology* 2001; **4** (15): 930-942.
- Alford RA, Richards SJ. Global amphibian declines: a problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1999; **30**:133-165.
- Amphibianweb. <www.amphibianweb.org>. Consultado 27 de abril 2011.
- Annis SL, Dastoor FP, Ziel H, Daszak & Longcore JE. A ADN-Based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Wildlife diseases* 2004; **3** (40): 420-428.
- Austin B, Gonzalez CJ, Stobie M. Recovery of *Janthinobacterium lividum* from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northern Ireland and Scotland. *Journal of Fish Diseases* 1992; **15**: 357-359.

- Austin DA, Jordan EM, Austin B. Recovery of an unusual Gram-negative bacterium from ulcerated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Scotland. *Journal of Fish Diseases* 2003; **26**: 247–249.
- Bai C, Garner TWJ, Li Y. First Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: Discovery of Chytridiomycosis in Introduced American Bullfrogs and Native Amphibians in the Yunnan Province, China. *EcoHealth* 2010; DOI: 10.1007/s10393-010-0307-0.
- Barrionuevo S, Mangione S. Chytridiomycosis in two species of *Telmatobius* (Anura: Leptodactylidae) from Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 2006; **73**: 171-174.
- Barrionuevo J, Aguayo R, Lavilla EO. First record of chytridiomycosis in Bolivia (*Rhinella quechua*, Anura: Bufonidae). *Diseases of aquatic organisms* 2008; **82**: 161-163.
- Bd-Maps.net. <http://www.spatialepidemiology.net/bd-maps>. Consultado el 20 de enero de 2011.
- Beard KH, O'Neill EM. Infection of an invasive frog *Eleutherodactylus cocqui* by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hawaii. *Biological Conservation* 2005; **126**:591-595.
- Becker CG, Zamudio KR. Tropical amphibian populations experience higher disease risk in natural habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; Doi/10.1073/pnas.1014497108.
- Brecker MH, Brucker RM, Schwantes CR, Harris RN, Minbiole KPC. The Bacterially Produced Metabolite Violacein Is Associated with Survival of

Amphibians Infected with a Lethal Fungus. *Applied and environmental microbiology* 2009; **75**:6635-6638.

- Brecker MH, Harris RN. Cutaneous Bacteria of the Redback Salamander Prevent Morbidity Associated with a Lethal Disease. *Plos One* 2010; Doi:10.1371/journal.pone.0010957
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocombe R., Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes H. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 1998; **95**: 9031-9036.
- Berger L, Speare R, Kent A. Diagnosis of chytridiomycosis of amphibians by histological examination. *Zoos Print Journal* 1999; **15**:184-190.
- Berger L, Speare R, Hines H, Marantelli G, Hyatt AD, McDonald KR, Skerratt LF, Olsen V, Clarke JM, Gillespie G, Mahony M, Sheppard N, Williams C, Tyler M. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Australian Veterinary Journal* 2004; **82**:31-36.
- Berger L, Hyatt AD, Speare R, Longcore JE. Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 2005a; **68**:51-63.
- Berger L, Marantelli G, Skerratt LF, Speare R. Virulence of the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, varies with the strain. *Diseases of Aquatic Organisms* 2005b; **68**:47-50.

- Blaustein AR, Wake DB, Sousa WP. Amphibian Declines: judging stability, persistence, and susceptibility of population to local and global extinctions. *Conservation Biology* 1994; **1**(8):60-71.
- Blaustein AR, Hoffman PD, Kiesecker JM, Hays JB. DNA repair activity and resistance to solar UV-B radiation in eggs of the Red-legged frog. *Conservation Biology* 1996; **10**: 1398-1402.
- Blaustein AR, Kiesecker JM. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations *Ecology Letters* 2002; **5**:597-608.
- Bonaccorso E, Guayasamin JM, Mendez D, Speare R. Chytridiomycosis as a possible cause of population declines in *Atelopus cruciger* (Anura: Bufonidae). *Herpetological Review* 2003; **4**(34):331-334.
- Boyle DG, Boyle DB, Olsen V, Morgan JAT & Hyatt AD. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real - time Taqman PCR assay. *Diseases of aquatic organisms* 2004; **60**:141-148.
- Bradley GA, Rosen PC, Sredl MJ, Jones TR, Longcore JE. Chytridiomycosis in native Arizona frogs. *Journal of Wildlife Diseases* 2002; **1**(38):206-212.
- Bridge PD, Arora DK. Interpretation of PCR methods for species definition. Application of PCR in mycology. *CAB International* 1998:63-67.
- Briggs CJ, Knapp RA, Vredenburg VT. Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; **21**(107): 9695-9700.
- Brucker RM, Baylor CM, Walters RL, Lauer A, Harris RN, Minbiole KPC. The Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an Antifungal Metabolite

Produced by Cutaneous Bacteria of the Salamander *Plethodon cinereus*. *Journal Chemical Ecology* 2008a; **34**: 39-43.

- Brucker RM, Harris RN, Schwantes CR, Gallaher TN, Flaherty DC, Lam BA, Minbiole KPC. Amphibian Chemical Defense: Antifungal Metabolites of the Microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the Salamander *Plethodon cinereus*. *Journal Chemical Ecology* 2008b; **34**: 1422-1429.
- Burrowes PA, Joglar RL, Green DE. Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica* 2004; **60**: 141-154.
- Bustin SA, Benes V, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 2005; **34**: 597-601.
- Carey C, Heyer R, Wilkinson J, Alford R, Arntzen J, Halliday T, Hungerford L, Lips KR, Middlenton EM, Orchard SA, Rand S. Amphibian declines and environmental change: use of remote-sensing data to identify environmental correlates. *Conservation Biology* 2001; **4**(15): 903-913.
- Carnaval ACOD, Puschendorf R., Peixoto OL, Verdade VK, Rodríguez MT. Amphibian Chytrid Fungus Broadly Distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. *EcoHealth* 2006; **3**(1):41-48
- Conlon MJ, Woodhams DC, Raza H, Coquet L, Leprince J, Jouenne T, Vaudry H, Rolling-Smith LA. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). *Toxicon* 2007; **50**: 498-506.
- Conlon JM, Iwuamuro S, King JD. Dermal Cytolytic Peptides and the System of Innate Immunity in Anurans. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology* 2009a; **1163**:75-82.

- Conlon MJ, Abdel-Wahab YHA, Flatt PR, Leprince J, Vaudry H, Jouenne T, Condamine E. A glycine-leucine-rich peptide structurally related to the plasticins from skin secretions of the frog *Leptodactylus laticeps* (Leptodactylidae). *Peptides* 2009b; **30**: 888-892.
- Conlon JM, Mechkarska M, Ahmed E, Coquet L, Jouenne T, Leprince J, Vaudry H, Hayes MP, Padgett-Floh G. Host defense peptides in skin secretions of the Oregon spotted frog *Rana pretiosa*. Implications for species resistance to chytridiomycosis. *Developmental and Comparative Immunology* 2011; **35**: 644-649.
- Crump ML. Reproductive Strategies in a Tropical Anuran Community. University of Kansas. *Museum of Natural History* 1974; (61): 10-17.
- Daszak P, Berger L, Cunningham AA, Hyatt AD, Green DE, Speare R. Emerging infectious diseases & amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases* 1999; **5**: 735-748.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 2003; **9**:141-150.
- Davidson EW, Parris M, Collins JP, Longcore JE, Pessier AP, Brunner J. Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia* 2003; **3**:601-607.
- Davis AK, Keel MK, Ferreira A, Maerz JC, Effects of chytridiomycosis on circulating white blood cell distributions of bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Comparative Clinic Pathology* 2010; **19**:49-55.

- Demain AL, Fang A. The Natural Functions of Secondary Metabolites. *Biotechnology* 2000; **69**:1-37.
- Díaz L, Cadiz A, Chong A, Silva A. First report of chytridiomycosis in a dying toad (Anura: Bufonidae) from Cuba: A new conservation challenge for the island. *EcoHealth* 2007; **4** (2):172-175
- Dourado FS, Leite JRSA, Silva LP, Melo JAT, Bloch C, Schwartz EF. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*. *Toxicon* 2007; **50**: 572-580.
- Drew A, Allen EJ, Allen LJ. Analysis of climatic and geographic factors affecting the presence of chytridiomycosis in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* 2006; **3**(68):245-250.
- Duran N, Justo GZ, Ferreira CV, Melo PS, Cordi L, Martins D. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2007; **48**: 127-133.
- Fellers GM, Green DE, Longcore JE. Oral chytridiomycosis in the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Copeia* 2001; **4**:945-953.
- Felger J, Enssle J, Mendez D, Speare R. Chytridiomycosis in El Salvador. *Salamandra* 2007; **2**(43):122-12.
- Fisher MC, Garner TWJ. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews* 2007; **21**: 2-9.

- Frias P, Vredenburg VT, Lopez MF, Longcore JE, Gonzalez E, Santos G, Zambrano L, Parra G. Chytridiomycosis Survey in Wild and Captive Mexican Amphibians. *EcoHealth* 2008; **5**: 18-26.
- Gallo SM, Palacio JA, Gutiérrez PD. Efectos del insecticida Clorpirofos sobre la tasa de crecimiento y la metamorfosis de *Smilisca paheota* (Cope, 19862) (Anura: Hyliidae). *Actual Biology* 2006; **28** (84): 51-58.
- Gillis M, De Ley J. The Genera *Chromobacterium* and *Janthinobacterium*. *Prokaryotes* 2006; **5**:737–746.
- González M. Determinación de la interacción de *Janthinobacterium lividum* y el hongo basidiomiceto *Itersonilia sp.* **Trabajo de grado pregrado**. Facultad de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana., Colombia, 2010, 25p.
- Green DE, Sherman CK. Diagnostic histological findings in Yosemite Toads (*Bufo canorus*) from a die-off in the 1970s. *Journal of Herpetology* 2001; **35**:92-103.
- Hanselmann R, Rodríguez A, Lampo M, Fajardo-Ramos L, Aguirre A, Kilpatrick M, Rodriguez JP, Daszak P. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biological Conservation* 2004; **120**: 115-119.
- Harris RN, James TY, Lauer A, Simon MA, Patel A. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *EcoHealth* 2006; **3**:53-56.
- Harris RN, Brucker RM, Walke JB, Brecker MH, HM, Schwantes CR, Flaherty DC, Lam BA, Woodhams DC, Briggs CJ, Vredenburg VT, Minbiole

KPC. Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus *The ISME Journal* 2009; **3**:818-824.

- Herrera RA, Steciow MM, Natale GS. Chytrid fungus parasitizing the wild amphibian *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) in Argentina. *Diseases of Aquatic Organisms* 2005; **3**(64):247-252.
- Hossack BR, Adams JM, Campbell EH, Pearl CA, Bettaso JB, Barichivich WJ, Lowe WH, True K, Ware JL, Corn PS. Low prevalence of chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian of U.S headwater stream. *Journal Herpetology*, 2010; **2**(44): 253–260.
- Hyatt AD, Boyle DG, Berger L, Obendorff D, Dalton A, Kriger K, Hero M, Hines H, Phillott R, Campbell R, Marantelli G, Gleason F, Colling A. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of aquatic organisms* 2007; **73**: 175-192.
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia (IDEAM). <http://institucional.ideam.gov.co/jsp/index.jsf>. Consultado el 05 Agosto de 2011.
- IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. www.iucnredlist.org. Consultado el 17 de enero de 2011.
- Johnson M, Speare R. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of Aquatic Organisms* 2005; **65**:181-186.
- Kiesecker JM, Blaustein AR, Miller CL. Transfer of a Pathogen from fish to amphibian. *Conservation Biology* 2001; **4**(15): 1064-1070.

- Kilburn VL, Ibañez R, Sanjur O, Bermingham E, Suraci JP, Green DV. Ubiquity of the Pathogenic Chytrid Fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in Anuran Communities in Panama. *EcoHealth* 2011; DOI: 10.1007/s10393-010-0634-1.
- Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends in Ecology and Evolution* 2010; **25**: 109-118.
- King JD, Ghaferi AN, Abraham B, Sonnevend A, Leprince J, Nielsen PF, Conlon MJ. Pentadactylin: An antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2005; **141**: 393-397.
- King JD, Leprince J, Vaudry H, Coquet L, Jouenne T, Conlon MJ. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the Caribbean frog, *Leptodactylus validus* (Anura: Leptodactylidae). *Peptides* 2008; **29**: 1287-1292.
- Kriger KM, Hines HB, Hyatt AD, Boyle DG, Hero JM. Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 2006; **71**:141-148.
- Kriger KM, Pereoglou F, Hero J-M. Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in Eastern Australia. *Conservation Biology* 2007; **5**(21):1280-1290.
- La Marca E, Lips KR, Lotters S, Puschendorf R, Ibañez R, Rueda-Almonacid JV, Schuller R, Marty C, Castro F, Manzanilla-Puppo J, Garcia-Perez JE, Bolaños F, Chaves G, Pounds AJ, Toral E, Young BE. Catastrophic

population declines and extinctions in neotropical harlequin frog (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica* 2005; **37**:190-201.

- Lam BA, Walke JB, Vredenburg VT, Harris RN. Proportion of individuals with anti-*Batrachochytrium dendrobatidis* skin bacteria is associated with population persistence in the frog *Rana muscosa*. *Biological Conservation* 2010; **143**:529-531.
- Lampo M, Barrio C, Han B. *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection in the Recently Rediscovered *Atelopus mucubajiensis* (Anura, Bufonidae), a Critically Endangered Frog from the Venezuelan Andes. *EcoHealth* 2007; **3**: 299-302.
- Laurer A, Simon MA, Banning JL, Andre E, Duncan K, Harris RN. Common Cutaneous Bacteria from the Eastern Red-Backed Salamander can inhibit pathogenic fungi. *Copeia* 2007; **3**:630-640.
- Laurer A, Simon MA, Banning JL, Lam BA, Harris RN. Diversity of cutaneous bacteria with antifungal activity isolated from female four-toed salamanders. *The ISME Journal* 2008; **2**:145-157
- Letcher PM, Powell MJ, Churchill PF, Chambers JG. Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota). *Mycological Research* 2006; **110**:898-915.
- Lips KR. Decline of a tropical montane amphibian fauna. *Conservation Biology* 1998; **12**:106-117.
- Lips KR. Mass mortality and population Declines of anurans at an Upland site in western Panama. *Conservation Biology* 1999; **13**:117-125.

- Lips KR, Green DE, Papendick R. Chytridiomycosis in wild frogs from Southern Costa Rica. *Journal of Herpetology* 2003; **37**:215-218.
- Lips KR, Mendelson JR, Munoz-Alonso A, Canseco-Marquez L, Mulcahy DG. Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation* 2004; **119**:555-564.
- Lips KR, Burrowes PA, Mendelson JR, Parra G. Amphibian declines in Latin America: widespread population declines extinctions, and impacts. *Biotropica* 2005; **37**:163-165.
- Lips, KR, Diffendorfer J, Mendelson J, Sears M. Riding the wave: Climate change, emerging infectious disease and amphibian declines. *Library of Science Biology* 2008; DOI:10.1371/journal.pbio.0060072.
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov. a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 1999; **91**: 219-227.
- Lu Y, Wang L, Xue Y, Zhang Ch, Xing X, Lou K, Zhang Z, Li Y, Zhang G, Bi J, Su Z. Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochemical Engineering Journal* 2009; **43**, 135–141
- Lynch JD, Grant T. Dying frogs in western Colombia: catastrophe or trivial observation? *Revista Academica Colombiana de Ciencias* 1998; **28**: 149-152.
- Marantelli G, Berger L, Speare R, Keegan L. Distribution of the amphibians chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pacific Conservation Biology* 2004; **10**: 173-179

- Martinez E, Gamble T, Vincent N, Cotner S. Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* at the Headwaters of the Mississippi River, Itasca State Park, Minnesota. USA. *Herpetological Review*, 2009; **1**(40):48-50.
- McCracken, S.F, Gaertner J.P, Forstner M.R.J, Hahn D. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians from the forest floor to the upper canopy of an Ecuadorian Amazon lowland rainforest. *Herpetological Review* 2009; **2**(40): 190-195.
- Melzer S, Bishop P.J. Skin peptide defences of New Zealand frogs against chytridiomycosis. *Animal Conservation* 2010; **1** (13) 44–52.
- Mendelson JR, Brodie ED, Malone JH, Acevedo ME, Baker MA, Smatresk NJ, Campbell JA. Factors associated with the catastrophic decline of a cloud forest frog fauna in Guatemala. *International Journal of Tropical Biology* 2004; **52**:991-1000.
- Middleton EM, Herman JR, Celarier EA, Wilkinson JW, Carey C, Russin RJ. Evaluating ultraviolet radiation exposure with satellite data at sites of amphibian declines in Central and South America. *Conservation Biology* 2001; **4** (15): 914-929.
- Morehouse EA, James TY, Ganley ARD, Vilgaly R, Berger L, Murphy PJ, Longcore JE. Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Molecular Ecology* 2003; **12**: 395-403.
- Morgan JAT, Vredenburg VT, Rachowicz LJ, Knapp RA, Stice MJ, Tunstall T, Bingham RE, Parker JM, Longcore JE, Moritz C, Briggs CJ, Taylor JW. Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium*

dendrobatidis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; DOI:10.1073./pnas. 0701838104.

- Murray AK, Skerratt LF, Speare R, McCallum. Impact and dynamics of disease in species threatened by the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biology* 2009; DOI: 10.1111/j.1523-1739.2009.01211.x
- Nakamura H, Kaneko S, Yamaoka Y, Kakishima M. PCR-SSCP analysis of the ribosomal DNA ITS regions of the willow rust fungi in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 1998; **64**:102-109.
- Nichols DK, Lamirande EW, Pessier AP, Longcore JE. Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *Journal of Wildlife Diseases* 2001; **1**(37):1-11.
- Organizacion mundial de la salud animal. <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2011/>. Consultado Abril 12 de 2011.
- Ouellet M, Mikaelian I, Pauli BD, Rodrigue J, Green DM. Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conservation Biology* 2005; **5**(19):1431-1440.
- Pantanella F, Berlutt F, Passariello C, Sarli S, Morea C, Schippa S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *The Society for Applied Microbiology* 2007; **102**: 992–999.
- Parsek MR, Greenberg EP. The connections between quorum sensing and biofilms. *Sociomicrobiology* 2005;**13**; 27-33.

- Peterson JD, Wood MB, Hopkins WA, Urine JM, Mendonca MT. Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in american bullfrog and southern leopard frog larvae from wetlands on the Savannah river site, South Carolina. *Journal of Wildlife Diseases* 2007; **3**(43):450–460.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001; **9** (29):2003-2007.
- Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. *S.A. Bustin*. 2004; **3**: 97-112.
- Pico AM, Collins JP. Amphibian Commerce as a Likely Source of Pathogen Pollution. *Conservation Biology* 2008; **6**(22):1582–1589.
- Pinilla G, Cubillos K, Rodríguez M. Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Publicación científica en ciencias biomédicas* 2008; **6**:66-75.
- Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JF. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 2004; **1**(96):9-15.
- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 2003, **3**: (18): 1-13.

- Pounds AJ, Crump ML, Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and harlequin frog. *Conservation Biology* 1994; **1** (8); 72-85.
- Pounds AJ. Climate and amphibian declines. *Nature* 2001; **410**: 639-640.
- Pounds AJ, Bustamante MR, Coloma LA, Consuegra JA, Fogden MPL, Foster PN, la Marca E, Masters KL, Merino-Viteri A, Puschendorf R, Ron SR, Sanchez-Azofeifa GA, Still CJ, Young BE. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* 2006; **439**:161-167.
- Powell MJ. Looking at mycology with a Janus face: A glimpse at chytridiomycetes active in the environment. *Mycologia*, 1993; **8**: 1-20.
- Puschendorf R, Bolanos F, Chaves G. The amphibian chytrid fungus along an altitudinal transect before the first reported declines in Costa Rica. *Biological Conservation* 2006a; **1**(132):136-142.
- Puschendorf R, Castañeda F, McCranie JR. Chytridiomycosis in wild frogs from Pico Bonito National Park, Honduras. *EcoHealth* 2006b; **3** (3):178-181.
- Puschendorf R, Carnaval AC, VanDerWal J, Zumbado-Ulate H, Chaves G, Bolaños F, Alford RA. Distribution models for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Costa Rica: proposing climatic refuges as a conservation tool. *Diversity and Distributions* 2009; **15**: 401–408.
- Quintero MP. Estimating infection level and vulnerability of Andean frog to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Trabajo de Grado de Maestría** Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, 2008,27p

- Rachowicz LJ, Vredenburg VT. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life states. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004; **61**: 75-83.
- Rachowicz LJ, Hero JM, Alford RA, Taylor JW, Morgan JAT, Vredenburg VT, Collins JP, Briggs CJ. The novel and endemic pathogen hypothesis: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conservation Biology* 2005; **5**(19):1441-1448.
- Ramírez MA. Detección de *Batrachochytrium dendrobatidis* por medio de técnicas moleculares y microbiológicas en ensamblajes de anfibios en las localidades de Santa María (Boyacá), Samaná (Caldas) y Guanentá (Boyacá). **Trabajo de grado pregrado**. Facultad de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, 2010, 20 p.
- Regina A, Creczynski-Pasa TB. Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. *Genetics and Molecular Research* 2004; **3** (1): 85-91
- Retallick RWR, McCallum H, Speare R. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLOS Biology* 2004; **2**(11): e351.
- Richmond JQ, Savage AE, Zamudio KR, Rosenblum EB. Toward immunogenetic studies of amphibian chytridiomycosis: linking innate and acquired immunity. *BioScience* 2009; **4** (59); 311-320.
- Rodríguez M, Rodríguez G. Métodos físico-químicos en Biotecnología. En: Stock RP (eds).PCR en Tiempo Real. México D.F., México, 2006: 2-53.

- Rollins-Smith LA, Conlon JM. Antimicrobial peptide defenses against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. *Developmental and Comparative Immunology* 2005; **7**(29):589-598.
- Ron SR, Merino A. Amphibian declines in Ecuador: overview and first report of chytridiomycosis from South America. *Froglog* 2000; **42**: 2-3.
- Ron SR, Duellman WE, Coloma LA, Bustamante MR. Population decline of the Jambato Toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology* 2003; **1**(37):116-126.
- Ron SR. Predicting the Distribution of the Amphibian Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. *Biotropica*, 2005; **2** (37):209-221.
- Rowley JLL, Skerratt LF, Alford RA, Campbell R. Retreat sites of rain forest stream frogs are not a reservoir for *Batrachochytrium dendrobatidis* in northern Queensland, Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* 2007; **1**(74):7-12.
- Rueda-Almonacid JV, Anfíbios y reptiles amenazados de extinción en Colombia. *Revista Académica Colombiana de Ciencias exactas, físicas y naturales* 1999; **23**:475-798.
- Rueda-Almonacid JV, Castro F, Cortez C. Técnicas para el inventario y muestreo de anfibios: Una compilación En: Angulo A., Rueda-Almonacid J. V., Rodríguez-Mahecha J. V., La Marca E (eds.) Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfíbios de la Región Tropical Andina. Conservación Internacional. 2006; 299pp.

- Ruiz A, Rueda-Almonacid JV. *Batrachochytrium dendrobatidis* and Chytridiomycosis in Anuran Amphibians of Colombia. *EcoHealth* 2008; **5**:27-33.
- Sánchez CJ, Shivshanka P, Stol K, Trakhtenbroi S, Sauer K, Hermans PWM, Orihuela CJ. The Pneumococcal Serine-Rich Repeat Protein Is an Intra-Species Bacterial Adhesin That Promotes Bacterial Aggregation In Vivo and in Biofilms. *PLoS Pathogens* 2010; DOI:10.1371/journal.ppat.100104.
- Sánchez D, Chacon-Ortiz A, Leon F, Han BA, Lampo M. Widespread occurrence of an emerging pathogen in amphibian communities of the Venezuelan Andes. *Biological Conservation* 2008; **141**; 289 8–2905.
- Scheffe JH, Lehman EK, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. *Journal of Molecular Medicine* 2006; **84**:901–910.
- Schlaepfer MA, Sred MJ, Rosen PC, Ryan MJ. High Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Wild Populations of Lowland Leopard Frogs *Rana yavapaiensis* in Arizona. *EcoHealth* 2007; **4**:421–427.
- Seimon TA, Seimon A, Daszak P, Halloy SRP, Schloegel LM, Aguilar CA, Sowell P, Hyatt AD, Konecky B, Simmons JE. Upward range extension of Andean anurans and chytridiomycosis to extreme elevations in response to tropical deglaciation. *Global Change Biology* 2007; **13**:288-299.
- Sitio oficial de Madrid Cundinamarca. <http://madrid-cundinamarca.gov.co/index.shtml>. Consultado el 23 de junio de 2011.

- Sitio oficial de Santa María Boyacá. <http://santamaria-boyaca.gov.co/index.shtml>. Consultado el 23 de Junio de 2011.
- Solis R, Lobos G, Walker S, Fisher M, Bosch J. Presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in feral populations of *Xenopus laevis* in Chile. *Biology Invasions* 2010; **12**:1641–1646.
- Swei A, Rowley JJJ, Rodder D, Diermos LL, Diermos AC, Briggs CJ, Brown R, Cao TT, Cheng TL; Chong RA, Han B, Hero JM, Hoang HD, Kruskini MD, Thuy Le DT, McGuire JA; Meegaskumbura M, Min M, Mulcahy DG, Neang T, Phimmachak S, Rao D, Reeder NM, Schoville SD, Sivongxay N, Srei N, Stock M, Stuart BL, Torres LS, Tran DTA, Tunstal TS, Vieites D, Vredenburg VT. Is Chytridiomycosis an Emerging Infectious Disease in Asia? *PLoS ONE* 2011; DOI:10.1371/journal.pone.0023179.
- Symonds EP, Trott DJ, Bird PS, Millis P. Growth characteristics and enzyme activity in *Batrachochytrium dendrobatidis* isolates. *Mycopathologia* 2008; **166**:143–147.
- Toledo LF, Haddad CFB, Carnaval ACOQ, Britto FB. A Brazilian anuran (*Hylodes magalhaesi* Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a conservation concern. *Amphibian and Reptile Conservation* 2006a; **4**:17-21
- Toledo LF, Brito FB, Araújo OGS, Giasson LMO, Haddad CFB. THE Occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection *South American Journal of Herpetology* 2006b; **1**(3): 185-191.

- Torres AJ, Baca BE. Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos* 1995; **3** (23):16-21.
- Une Y, Kadekaru S, Tamukai K, Goka K, Kuroki T. First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. *Diseases of aquatic organisms* 2008; **2** (82): 157-160.
- Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances Physiology Education* 2005; **29**: 151–159.
- Valgas C, Machado de Souza S, Smania EF, Smania A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian journal of microbiology* 2007; **38**:369-380.
- Velásquez BE, Castro F, Bolívar-GW y Herrera MI. Infección por el hongo quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* en anuros de la cordillera occidental de Colombia. *Herpetotropicos* 2008; **4** (2):65-70.
- Voyles J, Berger L, Young S, Speare R, Webb R, Warner J, Rudd D, Campbell R, Skerratt LF. Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of Aquatic Organisms* 2007; **77**:113-118.
- Voyles J. Phenotypic profiling of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a lethal fungal pathogen of amphibians. *Fungal Ecology* 2011; DOI:10.1016/j.funeco.2010.12.003.
- Vredenburg VT, Summers AP. Field identification of chytridiomycosis in *Rana muscosa* (Camp 1915). *Herpetological Review* 2001; **32**:151-152.

- Vredenburg V y Briggs C. Information on amphibian biology and conservation. Berkeley, California. http://amphibiaweb.org/chytrid/swab_instruction.pdf. Consultado Septiembre 18, 2010.
- Weldon C, du Preez LH, Hyatt AD, Muller R, Speare R. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases* 2004; **10**(12):2100-2105.
- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 2005; **39**:75-85.
- Woodhams DC, Alford RA, Marantelli G. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Diseases of Aquatic Organisms* 2003; **55**:65-67.
- Woodhams DC, Alford RA. Ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biology* 2005; **5**(19):1449-1459.
- Woodhams DC, Rollins-Smith LA, Carey C, Reinert L, Tyler MJ, Alford RA. Population trends associated with skin peptide defenses against chytridiomycosis in Australian frogs. *Oecologia* 2006a; **146**: 531-540.
- Woodhams DC, Voyles J, Lips K, Carey C, Rollins-Smith LA. Predicted disease susceptibility in a Panamanian amphibian assemblage based on skin peptide defenses. *Journal of Wildlife Diseases* 2006b; **2**(42): 207-218.
- Woodhams DC, Ardripadja K, Alford RA, Marantelli G, Reinert LK, Rollins-Smith LA. Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Animal Conservation* 2007; **10**: 409-417.

- Woodhams DC, Kilburn VL, Reinert LK, Voyles J, Medina D, Ibañez R, Hyatt AD, Boyle DG, Pask JD, Green DM, Rollins-Smith LA. Chytridiomycosis and amphibian population declines continue to spread eastward in Panama. *EcoHealth* 2008; **5**: 268–274.
- Young BE, Lips KR, Reaser JK, Ibañez R, Salas AW, Cedeño JR, Coloma LA, Ron S, La Marca E, Muñoz A, Bolaños F, Chaves G, Romo D. Population Declines and Priorities for Amphibian Conservation in Latin América. *Conservation Biology* 2001; **15**:1213-1223.

9. ANEXOS

Anexo 1. Altitud, Temperatura y Humedad relativa de los Municipios de muestreo

Departamento	Municipio	Altitud (m)	Temperatura (°C)	humedad (%)
Cundinamarca	San Antonio del Tequendama	1150	21	62
	Madrid	2592	14	71
Boyacá	Duitama	3559	19	81
	Santa María	850	24	80
Caldas	la Dorada	490	24	78
	Samaná	1550	21	73
Caquetá	Solita	250	28	92
	Morelia	258	28	92
	Valparaíso	210	28	92
Santander	Encino	2707	12.5	96
Casanare	Chameza	1100	20	89.5

Maní	200	26	80
------	-----	----	----

Anexo 2. Análisis estadístico de la curva de calibración

Data Source: Data 1 in curva de caibracion-1

Equation: Polynomial, Linear

$f=y_0+a*x$

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0.9915	0.9831	0.9747	0.6636

	Coefficient	Std. Error	t	P	VIF
y0	34.6070	0.5552	62.3352	0.0003	2.8000
a	-3.2030	0.2968	-10.7934	0.0085	2.8000

Analysis of Variance:

Uncorrected for the mean of the observations:

	DF	SS	MS
Regression	2	3604.0521	1802.0260
Residual	2	0.8806	0.4403
Total	4	3604.9327	901.2332

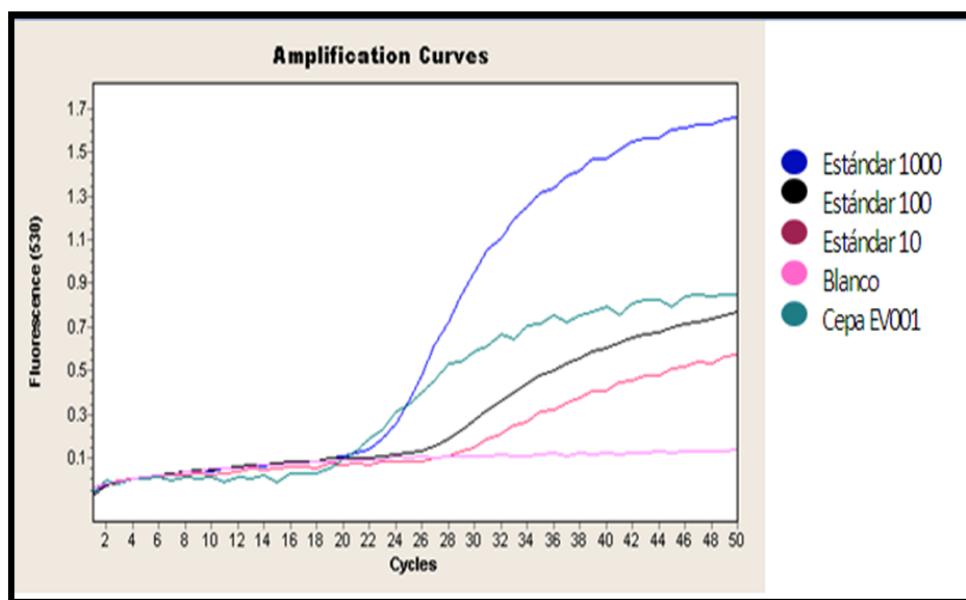
Corrected for the mean of the observations:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	51.2960	51.2960	116.4985	0.0085
Residual	2	0.8806	0.4403		
Total	3	52.1767	17.3922		

Anexo 3. Promedio y desviación estándar de las diluciones utilizadas para la curva de calibración

Estándar	Media Ct	Desviación Estándar
1000	24.49	0.74
100	28.82	0.41
10	31.69	0.22
1	34.21	0.81

Anexo 4. Curva de amplificación de la cepa Ev001



Anexo 5. Especies encontradas en los 12 municipios seleccionados para el muestreo.

Región Geográfica	Depto.	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 gr 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	<i>Dendropsophus labialis</i>	9	1
		San Antonio del Tequendama	<i>Dendropsophus padreluna</i>	34	0
			<i>Pristimantis</i>	8	0

		<i>renjiformis</i>		
		<i>Pristimantis susaguae</i>	10	0
		<i>Pristimantis</i> sp	1	0
		<i>Rheobates palmatus</i>	6	0
Boyacá	Duitama	<i>Pristimantis elegans</i>	2	0
	Santa María	<i>Bolitoglossa altamazonica</i>	5	0
		<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
		<i>Pristimantis frater</i>	1	0
		<i>Pristimantis medeni</i>	14	0
		<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	1	0
		<i>Rheobates palmatus</i>	5	0
		<i>Rhinella marina</i>	11	0
		<i>Rhinella gr margaritifera</i>	9	0
		<i>Rulyrana flavopunctata</i>	1	0
		<i>Siphonops annulatus</i>	1	0

Amazónica	Morelia	<i>Dendropsophus minutus</i>	2	0
		<i>Pristimantis lanthanites</i>	1	0
		<i>Scinax garbei</i>	1	0
	Solita	<i>Dendropsophus mathiassoni</i>	1	0
		<i>Dendropsophus minutus</i>	1	0
		<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
		Valparaíso	<i>Dendropsophus minutus</i>	1
	<i>Hypsiboas punctatus</i>		1	0
	<i>Leptodactylus mystaceus</i>		1	0
Caquetá	<i>Lithobates palmipes</i>	3	0	
	<i>Rhinella marina</i>	1	0	
	<i>Rhinella proboscidea</i>	1	0	
	<i>Scinax garbei</i>	1	0	
Orinoquia	Chameza	<i>Hyloscirtus bogotensis</i>	1	0
		<i>Hyalinobatrachium munozororum</i>	4	0

Casanare	<i>Leptodactylus colombiensis</i>	13	0
	<i>Pristimantis medemi</i>	10	0
	<i>Pristimantis savagei</i>	2	0
	<i>Pristimantis sp.</i>	1	0
Maní	<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

Anexo 6. Análisis estadístico regresión logística binaria de las variables ambientales

Variables in the Equation

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 0 Constant	-4.710	.580	65.945	1	.000	.009

Variables not in the Equation

			Score	df	Sig.
Step 0	Variables	Altitud	.261	1	.609
		Temperatura	1.955	1	.162
		Humedad	.028	1	.868
	Overall Statistics		2.169	3	.538

Anexo 7. Análisis estadístico Regresión lineal simple de las variables ambientales (Altitud).

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	74.547	22.351		3.335	.185
	Altitud	-.017	.014	-.775	-1.228	.435

Anexo 8. Análisis estadístico Regresión lineal simple de las variables ambientales (Temperatura).

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	54.734	110.942		.493	.708
	Temperatura	-.168	4.944	-.034	-.034	.978

Anexo 9. Análisis estadístico Regresión lineal simple de las variables ambientales (Humedad).

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	65.008	214.181		.304	.812
	Humedad	-.174	2.651	-.065	-.066	.958

Anexo 10. Resultados de la curva de crecimiento de *Janthinobacterium lividum*

Tiempo (Horas)	Absorbancia (530nm)	Log UFC.mL ⁻¹	Log células.mL ⁻¹
4	0,002	6,52	4,01
8	0,015	6,75	4,05
12	0,018	7,38	4,22
16	0,1	8,4	5,01
20	0,975	8,8	7,95
24	1,139	8,89	8,01
28	1,144	8,62	8,11
32	1,154	7,85	8,08
36	1,159	7,82	7,85
40	1,188	3,66	7,83
44	1,13	2,54	7,83
48	1,035	2,42	7,82
52	0,937	2,28	7,02

56	0,884	2,04	6,36
60	0,848	1,73	6,20
64	0,002	6,52	6,13
68	0,015	6,75	6,32

Anexo 11. Tabla de resultados de la prueba de antagonismo por difusión de metabolito en pozo

Replicas	Inhibición (mm)	
	Bacteria hora 32	Bacteria hora 52
1	5	17
2	4	18
3	6	19
Promedio	5	18

Anexo12. Medio de cultivo utilizado

Medio TGhL	
Componentes	Cantidad (g L ⁻¹)
Triptona	16
Gelatina Hidrolizada	4
Lactosa	2
Agar	10

Indicaciones: Disolver los componentes en agua destilada y aforar a un litro, calentar hasta ebullición, tapar y llevar a autoclave por 15 minutos a 121°C.