



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DEL HONGO BATRACHOCHYTRIUM
DENDROBATIDIS Y BATRACHOCHYTRIUM SALMANDRIVORANS
MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL EN MUESTRAS DE TEJIDOS DE
ANFIBIOS DE CENTROS DE CONSERVACIÓN DE QUITO

AUTOR

Solange Ariadne Alvarado Casamín

AÑO

2020



FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DEL HONGO *BATRACHOCHYTRIUM*
DENDROBATIDIS Y *BATRACHOCHYTRIUM SALMANDRIVORANS*
MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL EN MUESTRAS DE TEJIDOS DE
ANFIBIOS DE CENTROS DE CONSERVACIÓN DE QUITO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario y Zootecnista

Profesor Guía

Claire Christine Muslin

Autor

Solange Ariadne Alvarado Casamín

Año

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Detección de la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* y *Batrachochytrium salamandrivorans* mediante PCR en tiempo real en muestras de tejidos de anfibios de centros de conservación de Quito, a través de reuniones periódicas con el estudiante Solange Ariadne Alvarado Casamín, en el semestre 202020, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Claire Christine Muslin

PhD en Virología

C.I. 1759007733

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Detección de la presencia del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* y *Batrachochytrium salamandrivorans* mediante PCR en tiempo real en muestras de tejidos de anfibios de centros de conservación de Quito, de Solange Ariadne Alvarado Casamín, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.



DMVZ. Olga Alexandra Angulo Cruz MSc.

C.I. 1714976295

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

SOLANGE ARIADNE
ALVARADO
CASAMIN

Firmado digitalmente por
SOLANGE ARIADNE
ALVARADO CASAMIN
Fecha: 2020.08.22 19:24:19
-05'00'

Solange Ariadne Alvarado Casamín

C.I. 1719894865

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre por ser mi ejemplo a seguir, guía y apoyo en cada reto de mi vida. A mi familia, amigos y maestros que supieron ayudarme a culminar esta etapa. Especialmente a la Dra. Claire Muslin y el Dr. Alexander Genoy quienes fueron un soporte constante en la culminación de este trayecto.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi madre Gloria Casamín a quien le debo todos los logros de mi vida. A Lisa quien fue la inspiración para perseguir mi sueño y empezar la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

RESUMEN

Actualmente, los anfibios han experimentado pérdidas de población en todo el mundo por enfermedades infecciosas como la quitridiomycosis. El siguiente estudio se enfocó en hallar la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) en anfibios en cautiverio y de campo. El muestreo se realizó mediante hisopados de piel en animales vivos y en los animales muertos se realizó la extracción de diferentes tejidos como: piel, cavidad oral, tejido de extremidades. Se realizó la extracción de ADN y se hizo el diseño y la estandarización de dos ensayos de PCR en tiempo real para cada hongo usando: primers para *Bd* forward CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC, reverse GCATTTTCGCTGCGTTCTTCA, y sonda [FAM]TTGACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCAA y para *Bsal* primers forward ATCTCCCCCTTTCATCCCTAA, reverse CATCGAATCTTTGAACGCACATTG y sonda [HEX]CTATTGATTCTCAAACAGGCATACTCTACA. Se utilizó un protocolo de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, alineamiento y extensión a 63°C por 15 segundos por un total de 45 ciclos. Se procesaron 126 muestras de 47 animales, dando como resultado 14 animales positivos para *Bd* y 9 positivos para *Bsal*, siendo las especies más afectadas *Gastrotheca riobambae* y *Gastrotheca orophylax*, lo que confirma la presencia de la infección en especies nativas y en una especie exótica *Ambystoma mexicanum*. Los resultados indican una alta frecuencia del 30% de infección por *Bd* en los centros de conservación de anfibios de Quito. Al obtener resultados positivos para *Bsal* con el 19% de frecuencia, se puede confirmar como uno de los primeros hallazgos de la infección en América del Sur, lo que indica la importancia del control en el comercio de especies silvestres y reafirma la necesidad de continuar con la investigación de estos patógenos en poblaciones de diferentes biorregiones e instituciones de conservación del país.

ABSTRACT

Nowadays, amphibians have experienced significant loss of their population worldwide due to infectious diseases such as chytridiomycosis. This study is focused in finding the presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) and *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) in captive and wild amphibians. Sampling was made by taking swabs of skin in live animals and tissue extraction of skin, oral cavity and limbs from death specimens. A DNA extraction was made and a real time PCR assay was developed for each fungus species using: primers for Bd forward CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC, reverse GCATTTTCGCTGCGTTCTTCA and [FAM]TTGACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCAA. For Bsal primers forward ATCTCCCCCTCTTCATCCCTAA, reverse CATCGAATCTTTGAACGCACATTG and [HEX]CTATTGATTCTCAAACAGGCATACTCTACA. The protocol used was a 95°C denaturalization for two minutes, lining and extension at 63°C for 15 seconds in a total of 45 cycles. 126 samples were processed from 47 animals, giving as a result 14 positive animals for Bd and 9 for Bsal, the more affected species were *Gastrotheca riobambae* and *Gastrotheca orophylax*, which confirms the presence of this pathogen in native species and also one exotic species, *Ambystoma mexicanum*. Results indicate a high frequency of 30% of the Bd infection in amphibian conservation centres of Quito. Obtaining positive results for Bsal with 19% of frequency proves to be one of the first findings of this infection in South America, which indicates the importance of control in terms of the commercialization of wild species and reaffirms the need to continue investigating these pathogens in different populations of variable regions and conservation institutions around the country.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
1.2 Hipótesis.....	3
2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Quitridiomicosis.....	4
2.1.1 Especies susceptibles.....	4
2.2 Características biológicas.....	5
2.2.1 Clasificación taxonómica.....	5
2.2.2 Morfología.....	5
2.2.3 Ciclo de Vida.....	6
2.2.4 Hábitat.....	7
2.2.5 Órganos y Tejidos infectados.....	8
2.3 Linajes de <i>Batrachochytrium</i>	9
2.3.1 Distribución Mundial de Linajes de Bd.....	9
2.3.2 Virulencia de los Linajes de Bd.....	11
2.3.3 Origen de <i>Batrachochytrium Dendrobatidis</i>	11
2.3.4 Origen de <i>Batrachochytrium Salamandrivorans</i>	12
2.4 PCR en Tiempo Real.....	14
2.4.1 Elementos químicos.....	15
2.4.2 Fases de la PCR.....	15
2.5 Situación actual.....	17
3. CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Ubicación.....	18
3.2 Población y muestra.....	19
3.3 Criterios de Inclusión.....	20
3.4 Materiales.....	21
3.5 Metodología.....	22
3.5.1 Levantamiento de Información.....	22
3.5.2 Recolección de Muestras.....	22

3.5.3	Extracción de ADN	23
3.5.4	Ensayo de PCR	23
3.5.5	Diseño y Estandarización de la PCR en tiempo real	24
3.5.6	Variables.....	25
3.5.7	Análisis Estadístico.....	25
4.	CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1	Resultados.....	26
4.1.1	Diseño de Primers y Sondas	26
4.1.2	Control Positivo	26
4.1.3	Estandarización	27
4.1.4	Curva Estandar	28
4.1.5	Resultados de Bd y Bsal.....	29
4.1.6	Frecuencia de infección por Bd y Bsal.....	31
4.1.7	Frecuencia de la infección por Bd y Bsal en los centros de conservación Vivarium y Jambatu	32
4.1.8	Frecuencia de infección y coinfección por Bd y Bsal en las distintas especies de anfibios	33
4.1.9	Análisis Estadístico.....	36
4.1.10	Discusión	37
4.1.11	Limitantes.....	40
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
5.1	Conclusiones.....	42
5.2	Recomendaciones.....	43
	REFERENCIAS.....	44
	ANEXOS	50

Índice de Tablas

Tabla 1. Descripción del Clima de los Centros de Conservación de Anfibios de Quito (Climate-data.org, 2019)	18
Tabla 2. Descripción del Clima del Centro de Conservación Jambatu (Climate-data.org, 2019).....	19
Tabla 3. Prueba de concentraciones de sondas y primers para Bd y Bsal.	24
Tabla 4. Variables independientes para el estudio de detección de Batrachochytrium.....	25
Tabla 5. Secuencias de cebadores y sondas utilizadas en la PCR cuantitativa para la detección de Bd y Bsal.....	26
Tabla 6. Preparación del Mix (GoTaqProbe qPCR Master Mix)	27
Tabla 7. Condiciones de Estandarización.....	28
Tabla 8. Resultados del procesamiento de muestras de 47 anfibios para Bd y Bsal mediante la estandarización de PCR en tiempo real.	29
Tabla 9. Infección y coinfección de Batrachochytrium dendrobatidis y Batrachochytrium salamandrivorans en las distintas especies de anfibios	34
Tabla 10. Prueba de Fisher para Bd entre Gastrotheca orophylax y Espadarana audax del Centro Jambatu	36
Tabla 11. Prueba de Fisher para Bsa entre Gastrotheca orophylax y Esparadana audax del Centro Jambatu	37

Índice de Figuras

Figura 1. Morfología del hongo Batrachochytrium. Tomado de trilobiteglassworks©.....	6
Figura 2. Ciclo de vida Bd. Tomado de Rosenblum et al., 2010©.	7
Figura 3. Lesiones de quitridiomycosis A) Necrosis focal en caudata en zona dorsal. B) Inflamación y destrucción de queratina en miembro anterior izquierdo. C) Zona eritematosa en cavidad ventral. D) Muerte de renacuajo por lesiones a nivel bucal. Tomado de Stephen J. Price et al©.	8
Figura 4. Distribución Mundial de Linajes de Bd. A) Distribución de la diversidad de linajes en cada continente: Asia (Bd ASIA-1, Bd ASIA2/Bd Brasil, Bd GPL), América del Sur (Bd ASIA-2/Bd Brasil, Bd GPL), África (Bd CAPE, Bd GPL), Europa (Bd CAPE, Bd GPL), América del Norte (Bd GPL) y Australia (Bd GPL). B) Representación radial de los cuatro principales linajes divergente de Bd: Bd ASIA-1, Bd ASIA-2/ Bs Brasil, Bd CAPE y Bd GLP. Tomado de O’Hanlon et al., 2018.....	10
Figura 5. Distribución Mundial de Bd y Bsal.....	13
Figura 6. Mapa de distribución de los Centros de Conservación de Anfibios en la Ciudad de Quito. Tomado de Google Maps 2020.	18
Figura 7. Amplificación de Bd muestras positivas.....	27
Figura 8. Curva estándar de PCR en tiempo real par Bd obtenido con diluciones en serie de 10 veces que muestran una alta correlación lineal (RSq = 0.995).....	28
Figura 9. Frecuencia de infección por Bd y Bsal en los centros de conservación de anfibios.	31
Figura 10. Frecuencia de quitridiomycosis en los centros de conservación de anfibios	32
Figura 11. Distribución de anfibios infectados por Bd según la especie.	33
Figura 12. Distribución de anfibios infectados por Bsal según la especie	34
Figura 13. Frecuencia de infección por Bd y Bsal en las diferentes especies de anfibios	35

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La quitridiomycosis es una de las enfermedades infecciosas panzoóticas más letales que se encuentra afectando a las especies de anfibios (Anura, Caudata, Gymnophiona). En los últimos años se describe que ha atacado a más del 90% de poblaciones de anfibios lo que ha causado la pérdida de poblaciones y extinciones de algunas especies (Asamblea de delegados World Organisation for Animal Health, 2012). El hongo *Batrachochytrium* se encuentra dentro del estudio realizado por GISP (Global Invasive Species Programme) determinando que se encuentra dentro del grupo de especies exóticas invasivas más perjudiciales del mundo (Lowe, S. 2004). Según un estudio realizado por la Universidad Autónoma de Australia esta enfermedad ha tenido grandes repercusiones en todo el mundo, siendo Sudamérica el continente más afectado ya que es considerado el más importante en diversidad de anfibios, sobre todo en ranas (Scheele et al., 2019). Existen dos especies de quitridos letales que causan esta infección *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) y *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal), afectando especialmente a los anfibios que se encuentran en zonas montañosas. En América Latina no se ha reportado la presencia de Bsal, pero se teme que si es introducida devastará a las comunidades de urodelos y podría tener graves impactos ecológicos y económicos, incluida la posible extinción de especies (Martel et al., 2018) a diferencia de Bd que se encuentra presente en los cinco continentes.

Ecuador se encuentra dentro de la lista de países Latinoamericanos más afectados por la pérdida y extinción de anfibios, llegando a ubicarse en la tercera posición en el mundo con un gran número de especies amenazadas. La pérdida de las poblaciones de anfibios en el país se ha reportado desde principios de la década de 1990 (Coloma, 1995) y la evidencia de investigaciones sugiere que

las familias de al menos 25 especies de anuros pueden haber disminuido (Ron et al., 2003).

Años atrás se utilizaban técnicas como el examen histológico e inmunohistoquímica para la detección de la infección por *Batrachochytrium* mediante los dígitos de los miembros de los individuos (Berger et al., 2002) pero estos métodos son invasivos especialmente en las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad. Con el pasar de los años se han ido desarrollando pruebas diagnósticas más específicas mediante técnicas moleculares como la PCR donde se amplifican las regiones ITS-1/ITS-2 para hallar la presencia o ausencia de este hongo. Como lo menciona Boyle et al, (2004) implemento un ensayo de PCR en tiempo real (qPCR) para cuantificar e identificar con mejor precisión el ADN o las zoosporas en una muestra de tejido o mediante swabs facilitando encontrar al quítrido, tanto en poblaciones en cautiverio como de campo, siendo la técnica menos invasiva con más especificidad y sensibilidad.

El presente estudio tuvo como finalidad la detección de los hongos Bd y Bsal mediante el diseño y la estandarización de ensayos específicos de PCR en tiempo real en dos centros de conservación de anfibios de la ciudad de Quito, para determinar la frecuencia de infección de Bd y la presencia de Bsal este hongo no ha sido reportado en América del Sur. De esta manera se pudo evidenciar la importancia en mejorar el control en el comercio ilegal de especies silvestres y fomentar al cuidado de la biodiversidad del país.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Detectar mediante PCR en tiempo real la presencia de Bd y Bsal en muestras de tejidos e hisopados de piel de anfibios de dos centros de conservación de Quito, para estimar la frecuencia de quitridiomycosis.

1.1.2 Objetivos específicos

Diseñar y Estandarizar dos ensayos de PCR en tiempo real para detectar la presencia del ADN de Bd y Bsal en los laboratorios de la Universidad de las Américas.

Estimar la frecuencia de la infección de Bd en anfibios de dos centros de conservación de Quito mediante la técnica de PCR en tiempo real.

Determinar la presencia de Bsal mediante la técnica de PCR en tiempo real en los distintos anfibios de dos centros de conservación de Quito para hallar la infección en caudatas.

1.2 Hipótesis

Los anfibios que se encuentran en centros de conservación de anfibios en Quito presentan quitridiomycosis.

2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Quitridiomycosis

La quitridiomycosis es la causa de la mayor pérdida en poblaciones de anfibios porque ataca directamente a la piel. Estos poseen capilares en la dermis y epidermis, lo que les permite respirar, ser termorreguladores y osmorreguladores, convirtiéndolos en seres susceptibles a la contaminación, a la prolongación de luz e infecciones cutáneas (Ramirez, 2013). Uno de los síntomas más evidentes que esta enfermedad causa es el engrosamiento de la piel (hiperqueratosis) llegando a causar un desbalance osmótico en sus sales minerales y el agua en la sangre.

Este proceso causado por los hongos Bd y Bsal pueden llegar a interrumpir la respiración de la piel, puesto que allí se sitúan los zoosporangios llegando a causar un fallo cardíaco llevándolos a la muerte. Otro de los síntomas que provoca es la hiperplasia llegando a bloquear el intercambio de gases. El hongo produce toxinas que paralizan los glóbulos blancos causando apoptosis, alterando la respuesta inmunitaria y causando la muerte inminente. También es evidente observar úlceras, erosión del estrato córneo de la piel, necrosis focal, edema, anorexia, posturas anormales (Mendoza-Almeralla, Burrowes, & Parra-Olea, 2015).

2.1.1 Especies susceptibles

Se conoce que Bd se encuentra en los 6 continentes en catorce familias de anfibios y más de 300 especies. Bd ataca ranas, sapos y cecilias, mientras que Bsal afecta principalmente a salamandras y tritones, pero se conoce que el orden de Anura también puede llegar a presentar Bsal y ser reservorio. Este patógeno

llega a ser letal en todas las etapas del hospedador desde larvas, metomorfos y adultos, aunque no se ha detectado que afecte a los huevos (Asamblea de delegados World Organisation for Animal Health, 2012). Varios estudios han demostrado que algunas especies pueden llegar a ser reservorios de la infección siendo asintomáticos sobreviviendo en el medio o en especies simpátricas. Bd se ha llegado a considerar una amenaza para más del 95% de especies de anfibios que se encuentran en peligro crítico de extinción.

2.2 Características biológicas

2.2.1 Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

División: Chytridiomycota

Clase: Chytridiomycetes

Orden: Rhizophydiales

Familia: Incertae sedis

Género: *Batrachochytrium*

Especie: *Batrachochytrium dendrobatidis* / *Batrachochytrium salamandrivorans* (Martel, 2017).

2.2.2 Morfología

En el reino Fungí los quítridos están compuesto por esporas flageladas que contienen una red de rizoides, paredes lisas y esporangios como se muestra en la figura 1. Las zoosporas esféricas miden entre 3 - 5 μ m de diámetro, su cuerpo es alargado-ovoidal con un flagelo de 19 - 20 μ m de largo. En el periodo de

infestación la zoospora llega a enquistarse y el flagelo se reabsorbe llegando a formar parte de la pared (Ramirez, 2013), los rizoides empiezan a desarrollarse hasta llegar a ser zoosporangios jóvenes. Cuando el talo crece el citoplasma llega a tener varios núcleos por divisiones mitóticas hasta que se convierten en zoosporangios maduros.

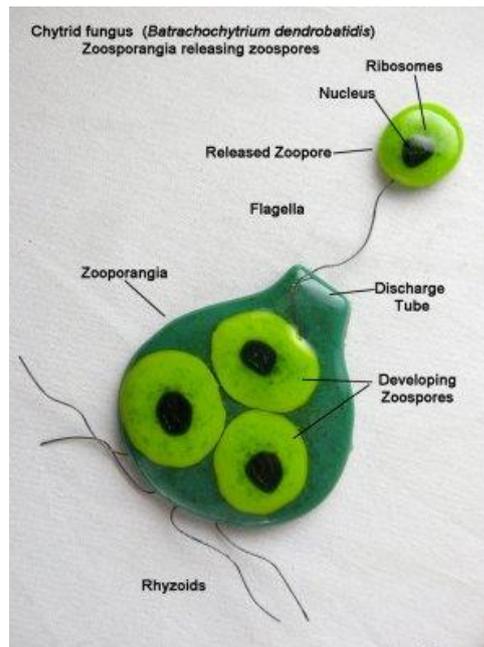


Figura 1. Morfología del hongo *Batrachochytrium*. Tomado de trilobiteglassworks©.

2.2.3 Ciclo de Vida

Este hongo presenta dos fases en su ciclo de vida:

- a) Fase sésil donde se encuentra el talo inmóvil monocéntrico que se convierte en un zoosporangio inoperculado para su reproducción asexual, el cual crece en la capa más superficial de la piel en la parte queratinizada.

- b) Fase móvil compuesta por la zoospora uniflagelada con poco tiempo de vida y es guiada por el agua para su expansión máxima en 24 horas llegando a la piel de los adultos y a la parte bucal de los renacuajos (Fig. 2) (Velasquez, 2014).

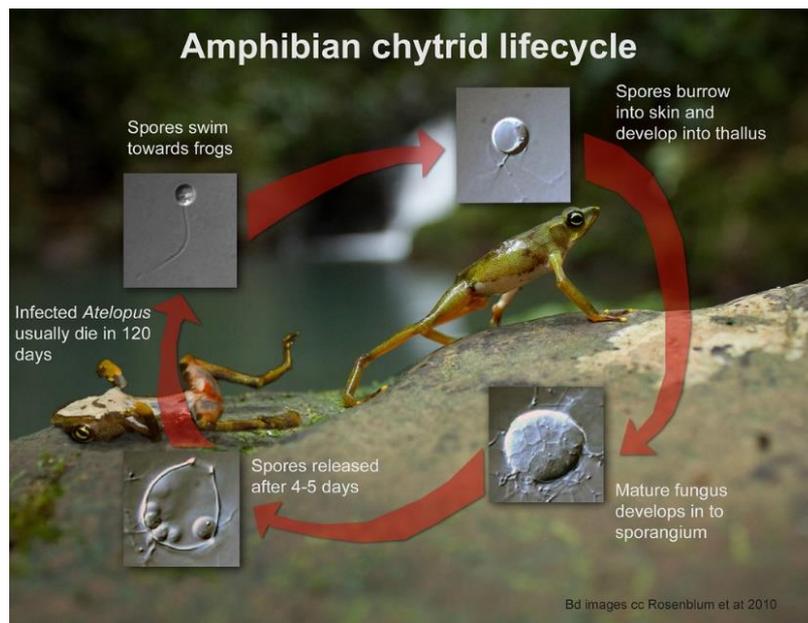


Figura 2. Ciclo de vida Bd. Tomado de Rosenblum et al., 2010©.

2.2.4 Hábitat

La supervivencia de Bd se asocia a los cambios de temperatura llegando adaptarse a climas fríos de hasta 4°C, y en temperaturas altas puede llegar a soportar los 25°C y un pH de 6 – 7 (Velasquez, 2014). Por otro lado, Bsal se adapta a temperaturas entre los 10° y 15°C una mayor temperatura causa su muerte inmediata. (EQUIPO SOS ANFIBIOS GUADARRAMA, 2015). Estos hongos no tienen la capacidad para soportar la desecación por lo que necesitan siempre de humedad, las zonas tropicales son óptimas para su supervivencia.

En varios estudios se ha encontrado que la interacción entre el huésped y el patógeno puede ser afectado por los cambios ambientales, por lo que se ha detectado que la mayor carga del patógeno en el organismo se encuentra durante el invierno (Velasquez, 2014).

2.2.5 Órganos y Tejidos infectados

La piel es el órgano predisponente a ser atacado por este hongo ya que el papel de este quitrido es descomponer quitina, queratina, celulosa y hemicelulosa (Ramirez, 2013). Se puede observar la muda excesiva de piel en la superficie epidérmica de cavidad celómica, extremidades y cavidad bucal (Asamblea de delegados World Organisation for Animal Health, 2012), también se pueden encontrar eritema, manchas oscuras en la zona dorsal, inflamación en la zona ventral del cuerpo y en las falanges (Anexo 4).

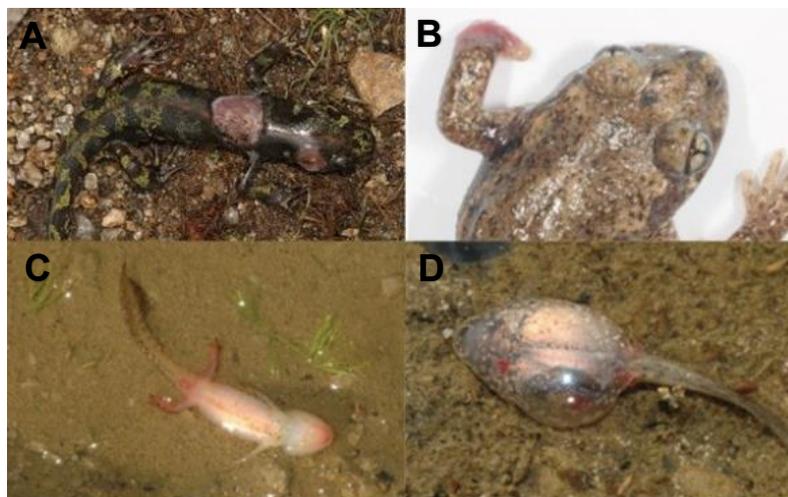


Figura 3. Lesiones de quitridiomycosis A) Necrosis focal en caudata en zona dorsal. B) Inflamación y destrucción de queratina en miembro anterior izquierdo. C) Zona eritematosa en cavidad ventral. D) Muerte de renacuajo por lesiones a nivel bucal. Tomado de Stephen J. Price et al©.

2.3 Linajes de *Batrachochytrium*

2.3.1 Distribución Mundial de Linajes de Bd

El Bd ha sido documentado en seis regiones a lo largo de la década: América Central (1970), Australia (1970 – 1990), América del Sur (1970 – 1980), Las Islas del Caribe (2000), América del Norte (1980 – 1990) y la Península Ibérica (1990). Existen distintos linajes de Bd como: Bd GLP (linaje panzoótico global), Bd CAPE (africano), Bd CH (europeo)/Bd ASIA-1 (reciente hallazgo en anfibios nativos de la península coreana), Bd BRASIL/ Bd ASIA-2 (de ranas toro invasoras de América del Norte en Corea) (Fig. 4). Se conocía que Bd CH era enzoótico para Suiza, pero recientemente se lo asocia con Bd ASIA-1. Se analizó un segundo linaje relacionado a Bd ASIA2 de ranas toro provenientes de América del Norte en Corea y está estrechamente relacionado con Bd Brasil. Por lo cual se establece que los principales linajes divergentes son Bd GLP, Bd CAPE, Bd ASIA-1 (incluyendo a Bd CH) y Bd ASIA-2/Bs Brasil (O’Hanlon et al., 2018).

En los distintos estudios se evidencia que la mayoría de los anfibios que presentan la enfermedad provienen de Corea del Sur o de comercios ilegales de mascotas de Bélgica, lo que demuestra que la península coreana es un centro global de Bd y que Asia oriental puede tener la población ancestral (O’Hanlon et al., 2018). Se realizó un agrupamiento de haplotipos basado en estudios bayesianos y como resultado se obtuvo que Bd ASIA-1 comparte diversidad con la población mundial de Bd. Llegando a considerar que la expansión de Bd GLP fue en siglo XX concordando con la expansión global de anfibios comercializados evidenciado el rotundo descuido en la bioseguridad internacional a pesar de la inclusión de Bd en la lista de la OIE en el 2008.

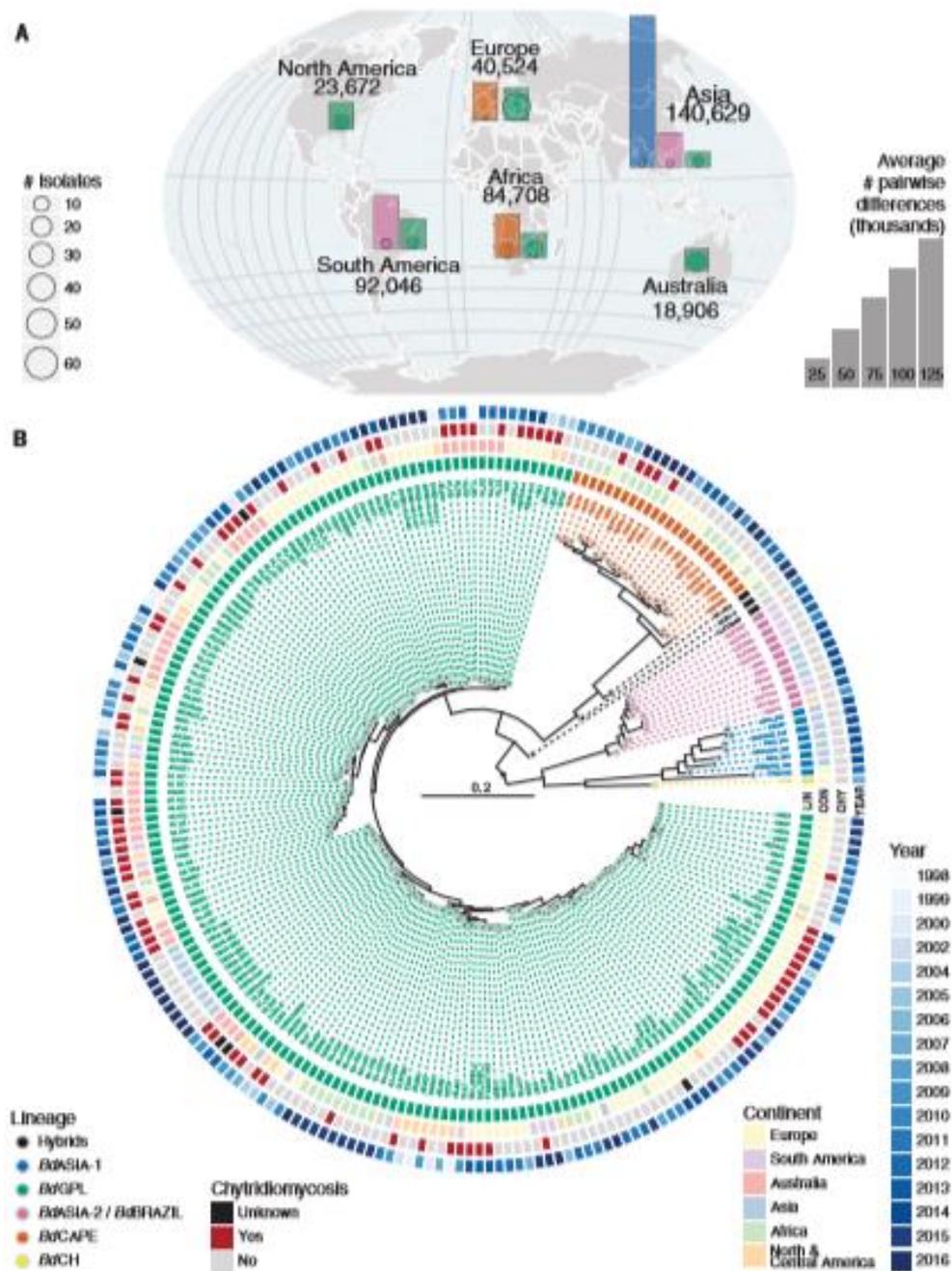


Figura 4. Distribución Mundial de Linajes de Bd. A) Distribución de la diversidad de linajes en cada continente: Asia (Bd ASIA-1, Bd ASIA2/Bd Brasil, Bd GPL), América del Sur (Bd ASIA-2/Bd Brasil, Bd GPL), África (Bd CAPE, Bd GPL), Europa (Bd CAPE, Bd GPL), América del Norte (Bd GPL) y Australia (Bd GPL). B) Representación radial de los cuatro principales linajes divergente de Bd: Bd ASIA-1, Bd ASIA-2/ Bs Brasil, Bd CAPE y Bd GLP. Tomado de O’Hanlon et al., 2018.

2.3.2 Virulencia de los Linajes de Bd

La gran variedad genotípica de los patógenos está asociada con la diversificación de los rasgos del huésped, y es medida con su capacidad de infectar al huésped y causar la infección (O'Hanlon et al., 2018). En un experimento se comprobó que las larvas son altamente sensibles a la infección, pero no mueren antes de la metamorfosis, al contrario que los juveniles pos-metamórficos son susceptibles a la infección mortal. Se evidencio que los renacuajos son más sensibles a Bd GPL y Bd ASIA-1 que a Bd CAPE y Bd CH.

En las pruebas de virulencia se detecta que los linajes Bd GPL y Bd CAPE pueden llegar a producir casos más graves y fatales estos presentaron un exceso significativo del <0.05 en comparación con Bd ASIA-1 y Bd ASIA-2/Bd BRASIL.

2.3.3 Origen de *Batrachochytrium Dendrobatidis*

El foco de infección a nivel mundial por quitridiomicosis llega a su punto máximo en la década de 1980, después de 18 años que se descubre la enfermedad, causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, llegando a ser una de las mayores amenazas para las distintas especies de anfibios (Asamblea de delegados World Organisation for Animal Health, 2012). Existen diversas teorías sobre el origen de Bd donde se menciona de forma similar que los principales lugares de procedencia son África, América y Asia (Fig. 5), en la siguiente investigación se describen los principales continentes donde existe la mayor prevalencia de la enfermedad desde el siglo XX y del cual se han encontrado y estudiado los principales linajes de Bd en las distintas especies.

Un estudio realizado por la Universidad North-West de Sudáfrica encontró que el primer anfibio positivo a quitridiomycosis fue una *Xenopus laevis* en 1938 hallada en las tierras bajas del Cabo Occidental (Weldon, Preez, Hyatt, Muller, & Speare, 2004). En los diferentes resultados se hallaron especímenes positivos de todas las regiones del sur de África en 1973 lo que indica que la infección se encontraba distribuida en el Cabo Occidental, Cabo del Norte, el Estado Libre, Kwazulu-Natal, Cabo Oriental y Swazilandia. Una de las teorías más acertadas para que inicie su propagación a nivel mundial es el comercio ilegal de especies silvestres dejando que el hongo se distribuya rápidamente y sea omnipresente.

En la investigación más reciente publicada por la revista Science se realizó un muestreo con anfibios positivos a Bd de todos los continentes, con la secuencia genómica completa de 177 aislamientos a gran profundidad, combinando genomas de estudios previos generando un representante global con un panel de 234 aislamientos. Dando como resultado al endemismo de Bd en Asia del cual se han originado múltiples linajes. El linaje más representativo es Bd GLP quien tuvo su expansión a principios del siglo XX infectando a más de 700 especies de anfibios. Confirmando que la infección panzoótica fúngica emergente en los anfibios es causada por linajes antiguos de filogeografía patógena que se va expandiendo a medida que el comercio mundial avanza sin restricciones a varias regiones infectando a nuevas especies generando nuevos brotes.

2.3.4 Origen de *Batrachochytrium Salamandrivorans*

Bsal fue descubierto en el año 2013 debido a la disminución significativa en poblaciones de salamandras de fuego en los Países Bajos (Fig. 5). La Universidad de Gante realizó una investigación mediante qPCR en muestras de hisopados de piel de 5391 individuos de cuatro continentes, dando como

resultado el hallazgo de salamandras como principales hospedadores de Bsal (*Cynops pyrrhogaste*, *Cynops cuanurus* y *Paramesotriton deloustali*), provenientes de Asia y Europa (Cantera, 2015). Mediante el estudio se logró determinar por estimaciones bayesianas que Bsal divergió del mismo phylum y orden de Bd en el periodo Cretácico tardío donde su reservorio evoluciono de los tritones asiáticos lo que nos sugiere que Asia (Vietnam, Japón y Tailandia) ha sido un reservorio natural durante los últimos 30 millones de años (Farrer, 2019). Por esto se determina que la expansión de Bsal está relacionada con el comercio internacional de mascotas (salamandras y tritones) donde coleccionistas las utilizan para participar en eventos de terrariofilia. Se estima que desde el año 2001 hasta el 2009 se importaron más de 2,3 millones de tritones de fuego desde China a EEUU, sin mencionar el comercio ilegal de estas especies, situación que representa un riesgo potencial (Cantera, 2015).

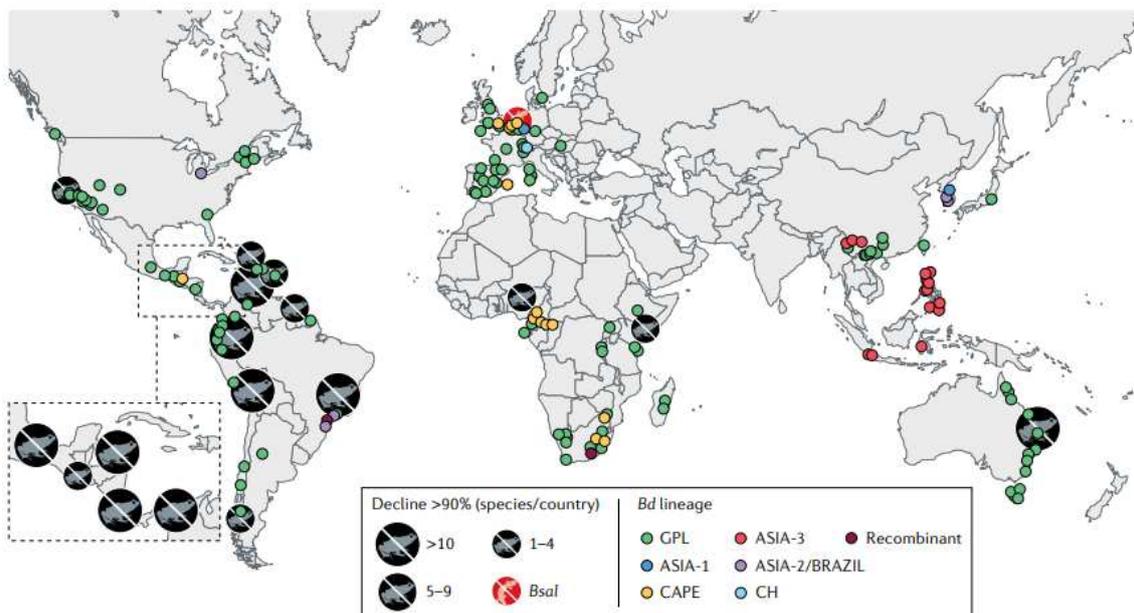


Figura 5. Distribución Mundial de Bd y Bsal. Se pueden observar las disminuciones que coinciden con el estudio de Scheele et al. Con la declinación extrema >90% de anfibios perdidos; y se confirma la extinción de varias especies en el medio silvestre según la lista de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Tomado de Fisher & Garner., 2020.

2.4 PCR en Tiempo Real

PCR conocida como reacción en cadena de polimerasa es considerado uno de los métodos diagnósticos con mayor sensibilidad para hallar ADN específico en tiempo real a partir de cantidades reducidas de la región de interés que es amplificada hasta un billón de veces en sentido 5' – 3' dependiendo de la doble cadena de ADN. Es una técnica cuantitativa que posee alta especificidad, un amplio rango de detección, y una rápida observación de resultados, existen distintos métodos que se basan en utilizar otra parte de ADN (sonda) que se ajusta a un fragmento intermedio de la molécula de ADN que se desea amplificar (Ramirez, 2013). Se utiliza un termociclador que sea capaz de percibir las manifestaciones fluorescentes para evaluar el progreso de la amplificación, es necesario que cuente con un hardware y software para la lectura de los resultados (Barrera Cubillos et al., 2016). Los principales elementos para realizar esta técnica son el molde (ADN), enzima, primers (oligonucleótidos), dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados), ion magnesio (Mg +), buffer, agua y fluoróforos que se adaptan al ADN o sondas específicas para fragmentos de ADN (sondas de hibridación, hidrólisis y horquilla). Estos elementos interactúan en tres fases: desnaturalización, hibridación y extensión.

La PCR en tiempo real se ha visto implicada en muchas de las investigaciones científicas, actualmente es una de las herramientas más usadas para el diagnóstico de bacterias, hongos, virus y patógenos por presentar mayor sensibilidad y especificidad en un ínfimo tiempo.

Reacción en cadena polimerasa múltiple es una técnica variada de la PCR punto final que se usa para amplificar varios fragmentos de ADN simultáneamente, usando múltiples pares de cebadores en una mezcla de reacción, los cuales

deben ser diseñados para trabajar a la misma temperatura de hibridación durante la PCR para que sean separados y observados mediante electroforesis en gel o sondas con mayor especificidad (Guest, 2017).

2.4.1 Elementos químicos

El principal componente es el ADN, seguido de la enzima conocida como Taq ADN polimerasa que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* la cual soporta temperaturas elevadas. Otro elemento importante son los primers o cebadores secuencias de oligonucleótidos que escoltan y delimitan el molde que va a ser amplificado, normalmente su tamaño va entre los 15 – 25 pares de bases. Los primers son dos secuencias conocidas como “forward” y “reverse” ambas diseñadas para combinar con el modelo y las cadenas de ADN puedan ser desplegadas por la enzima. Por otro lado, desoxirribonucleótidos trifosfatos son las bases nitrogenadas que generan las nuevas cadenas de ADN conjuntamente con la enzima (Aguilera et al., 2015). Para la amplificación del ADN durante la PCR se utilizan dos tipos de fluoróforos: a) con afinidad por el ADN o b) sondas específicas para regiones del ADN.

2.4.2 Fases de la PCR

a) Desnaturalización

En la primera fase la doble cadena de ADN es sometida a una temperatura de 95° C durante 20 a 30 seg. esto puede variar dependiendo de la secuencia del molde y la velocidad. Al final se obtendrá dos cadenas separadas de ADN que serán el molde para realizar el siguiente paso (Hammer, Ronen, & Kohen-Vacs, 2010).

b) Hibridación

En la segunda fase los cebadores se alinean desde el extremo 3' del molde separado y combinan su secuencia complementaria para formar el complejo molde-primers es de suma importancia que la temperatura melting se encuentre entre los 50 – 60°C para tener estabilidad y especificidad eficiente (Hammer et al., 2010). En este estudio se utilizó una sonda específica TaqMan la cual indica que mientras no haya unión de la sonda con la región específica, no habrá amplificación ni se emitirá la señal de fluorescencia.

c) Extensión

En la última fase la enzima actúa en el complejo molde-cebadores donde se dará inicio la catálisis a una rápida velocidad, se agregan desoxirribonucleótidos trifosfatos complementarios para generar hebras completas de ADN con una dirección de 5' a 3'. Para esta fase es necesaria una temperatura de 72°C. Al finalizar el ciclo se deben obtener amplicones del tamaño seleccionado (Hammer et al., 2010).

Cabe recalcar que la qPCR identifica y cuantifica las secuencias específicas del ADN seleccionado por medio de las sondas. Da a conocer la cantidad de ácido desoxirribonucleico en la muestra ayudando a ser inspeccionado mediante transcurre la reacción sin necesidad de usar gel de agarosa a diferencia de la PCR punto final. Actualmente este es el método más sensible de detección de ácidos nucleicos con una alta especificidad.

2.5 Situación actual

Uno de los principales declives en la conservación de fauna silvestre es la falta de información sobre el creciente número de anfibios afectados y el efecto en la flora y fauna que causa la quitridiomycosis. Actualmente existen 8,110 especies de anfibios a nivel mundial (amphibiaweb.org, 2020). En la investigación realizada por la Universidad Nacional Australiana se confirmó que América del Sur, Australia y Mesoamérica presentaban la mayor pérdida de anfibios respaldando la hipótesis de que Bd se extendió desde Asia al Nuevo Mundo. Se evidencio que se ha perdido alrededor del 45% de anuros pertenecientes a *Atelopus*, *Craugastor* y *Telmatobius*. También se describe que la mayor pérdida de especies se da en aquellas que presentan cuerpos prominentes y habitan en regiones húmedas, al contrario de las especies que se encuentran en rangos geográficos elevados que no favorecen al hongo. Actualmente en Latinoamérica 428 especies se encuentran en peligro de extinción y han presentado pérdidas en sus poblaciones. Los países con mayor impacto en América Latina son: Venezuela, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú debido a las condiciones climáticas (Scheele et al., 2019). Esto se debe a la alta patogenicidad que presenta el hongo que tiene un amplio rango de hospedadores, estos presentan una alta tasa de transmisión entre los mismos y su gran persistencia en el medio ambiente.

Ecuador se encuentra dentro de la lista de países principales en biodiversidad dentro de América del Sur, contando con 622 especies de anfibios descritos en los últimos años (BIOWEB, 2019). La presencia de Bd ha sido descrita en el país a finales de la década de los 90 (Crawford, 2009) mientras que Bsal no ha tenido hasta el momento ningún reporte, sin embargo, existen animales con lesiones acordes a la infección. Es una gran amenaza para las especies endémicas del país.

3. CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación

El siguiente estudio se realizó en los Laboratorios de la Universidad de las Américas en la sede Queri ubicado en la ciudad de Quito en la calle José *Queri* y Av. de los Granados.

Tabla 1. Descripción del Clima de los Centros de Conservación de Anfibios de Quito (Climate-data.org, 2019)

Altitud	2832 msnm
Temperatura	Anual es de 13.9° C
Precipitación	1273 mm al año
Clima	Templado y cálido. Con una inmensa cantidad de lluvia El clima se clasifica como Cfb (Oceánico templado).

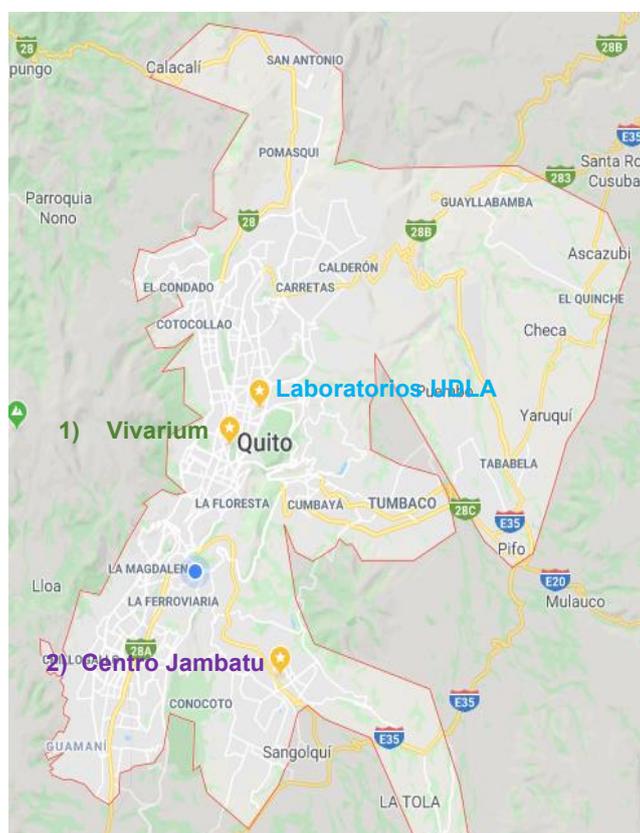


Figura 6. Mapa de distribución de los Centros de Conservación de Anfibios en la Ciudad de Quito. Tomado de Google Maps 2020.

Los animales recolectados llegaron de dos distintos centros de conservación de anfibios los cuales se encuentran ubicados en los alrededores de la ciudad de Quito, Ecuador:

- 1) Vivarium de Quito que se encuentra en el sector del Parque La Carolina ubicado en la Av. Amazonas 2925.
- 2) Centro Jambatu de investigación y conservación de anfibios (Fundación Jambatu) ubicado en el cantón Rumiñahui en la Av. General Rumiñahui y Calle Farina.

Tabla 2. Descripción del Clima del Centro de Conservación Jambatu (Climate-data.org, 2019)

Altitud	2474 msnm
Temperatura	Anual es de 15.5°C
Precipitación	1334 mm al año
Clima	Templado y cálido. Con una inmensa cantidad de lluvias. El clima se clasifica como Cfb (Oceánico templado)

3.2 Población y muestra

Población Total: Alrededor de 550 Anfibios en cautiverio de más de 40 especies en 2 centros de conservación de Quito

Población Individual de los centros es de:

Vivarium de Quito: centro especializado en el manejo, rescate y cuidado de reptiles y anfibios, con énfasis en la educación y conciencia ambiental al público.

Cuentan con 45 especies y alrededor de 200 individuos, de los cuales se recolectaron 12 individuos que presentaban lesiones en base a los criterios de inclusión.

Centro Jambatu: centro de conservación e investigación de anfibios. Mantiene cerca de 42 especies con alrededor de 350 individuos. Los animales que se recolectaron provenían la gran mayoría de campo (Provincia del Napo, Ecuador) de los cuales se recolectaron 35 individuos.

Muestra total: 47 anfibios

El presente estudio es parte de los proyectos de investigación de la Universidad de las Américas, los animales de este estudio fueron muestreados en base a las necesidades e interés de cada centro de conservación.

3.3 Criterios de Inclusión

En el centro Vivarium los criterios de inclusión fueron aquellos anfibios que presentaban lesiones en piel como: hiperplasia, hiperqueratosis, úlceras, anorexia, apatía y ataxia. Cabe recalcar que fueron animales en etapa adulta y ya habían fallecido.

En el centro Jambatu fueron anfibios vivos que se escogieron al azar, provenientes de campo y eran adultos.

3.4 Materiales

Laboratorio

Extracción de ADN

Equipos

- Centrifuga 1
- Termobloque 1
- Campana de Extracción (Sorbona) 1
- Refrigerador a -20°C 1

Reactivos

- Isopropanol 1
- Cloroformo 1
- Gamma-glutamilttransferasa (γ GT) 1
- Fenol 1
- Etanol al 70% 1
- Agua ultra pura 1

Ensayo de PCR

- Termociclador 1

Reactivos

- ADN (gBlocks) 1
- Primers 1
- Sondas 2
- Agua MQ 1
- Guantes 20

Oficina

- Esferos 4

- Pipeta 200 μ l 2
- Pipeta 1000 μ l 2
- Puntas con filtro 500
- Tubos eppendorf de 1,5ml 1000
- Rack para tubos eppendorf 4
- Vortex 1

Equipos

- Tubos eppendorf de 1,5ml 1000
- Pipeta 200 μ l 2
- Pipeta 1000 μ l 2
- Puntas con filtro 500
- Rack de tubos eppendorf 4
- Centrifuga 1

- Vortex 1

- Kit Go Taq Probe qPCR Master Mix (Promega) 1

Campo

- Mandil 1
- Gafas de protección 1
- Computadora 1

3.5 Metodología

3.5.1 Levantamiento de Información

Se procedió a realizar una búsqueda de literatura en artículos e investigaciones científicas sobre quitridiomycosis y sus efectos en los anfibios. Se obtuvo distintos métodos para realizar correctamente la técnica de detección de la infección mediante PCR en tiempo real con el fin de encontrar diferentes tipos de protocolos en anfibios.

3.5.2 Recolección de Muestras

Las muestras fueron recolectadas aproximadamente en dos meses junio y julio del 2019. Los animales muertos llegaron del Centro de Conservación Vivarium en los cuales se realizaron necropsias seleccionando tejido cutáneo de cavidad celómica, extremidades y cavidad bucal.

Mientras que aquellos animales que estaban vivos provenían del Centro de Conservación Jambatu en el cual se tuvo un solo día de recolección en el mes de julio del 2019 donde fueron seleccionados al azar y se les tomo la muestra mediante hisopados sobre la superficie epitelial pasándolos unas 20 veces. Los hisopos se introdujeron en tubos eppendorf para su transporte con el fin de realizar la detección molecular.

3.5.3 Extracción de ADN

Para realizar la extracción del ácido desoxirribonucleico se trabajó en base al protocolo de Green & Sambrook: Una vez tomadas las muestras se rotularon los tubos eppendorf de 1,5mL por cada muestra, se agregaron 600 μ l de isopropanol y se refrigeraron las muestras a - 20°C. Una vez preparada la solución se añadieron 600 μ l de Gamma-glutamyltransferasa por muestra. Se homogenizo con el vortex y se puso a incubar las muestras por 5 min. a temperatura ambiente. Inmediatamente se agregó 100 μ l de cloroformo por muestra y se repitió la homogenización. Posterior a esto se dejó incubar por 10 min. y se procedió a centrifugar a 12000rcf por 5min. Finalmente se transfirieron 500 μ l de la solución acuosa de la superficie a cada tubo con isopropanol y se dejó incubar a - 20°C por 24h.

3.5.4 Ensayo de PCR

El protocolo que se utilizó para el diseño de la PCR en tiempo real fue en base a los estudios realizados por Boyle (2004):

Una vez que se obtiene el ADN de las muestras se colocan en el vortex por 5 segundos y se centrifuga cada muestra. Se obtuvo un volumen final para cada reacción de 10 μ L, de los cuales 5 μ L fueron del master mix (GoTaq Probe qPCR), 1 μ L de primer forward, 1 μ L de primer reverse y 1 μ L de sonda en cada tubo. Finalmente, para el control positivo se añadieron 2 μ L de ADN y para el control negativo se utilizó agua destilada (Milli-Q®). Una vez colocados los 10 μ L estos fueron mezclados homogéneamente. Los tubos fueron transferidos al termociclador donde se especificó las siguientes condiciones, desnaturalización a 95°C por 2 minutos, alineamiento y extensión a 63°C por 15 segundos por un total de 45 ciclos por 2hr.

3.5.5 Diseño y Estandarización de la PCR en tiempo real

La siguiente estandarización tuvo como objetivo la estructuración de primers, sondas y hallar la temperatura ideal mediante la realización de pruebas para ser verificadas en base al control positivo.

Para el diseño de primers y sondas se utilizaron los programas Primer-BLAST y Primer3web 4.1.0 en los cuales se consideraron los siguientes criterios: temperatura de alineamiento, tamaño, contenido de GC, el complejo molde-primer y posición de la secuenciación (template).

Primero se buscó la temperatura ideal de extensión/alineamiento variando desde los 52°C, 54°C, 55.9°C, 60,3°C, 62°C, 63°C, 64°C hasta los 65°C para obtener una amplificación efectiva. Durante esta etapa, se utilizaron concentraciones fijas de primers y sondas de 400nM y 200nM respectivamente. La comparación de las curvas de amplificación permitió identificar una temperatura optima de 64° C. Posterior a esto se probaron distintas concentraciones de sondas y primers realizando un total de 8 pruebas con diferentes diluciones en base a una concentración conocida del control positivo de ADN (gBlocks) hasta determinar las concentraciones optimas de sondas y primers.

Tabla 3. Prueba de concentraciones de sondas y primers para Bd y Bsal.

Prueba	Concentración de primers	Concentración de sondas
A	400nM primers forward 200nM primers reverse	250/200 nM probes
B	800nM primers forward 400nM primers reverse	250/200 nM probes
C	800nM primers forward 800nM primers reverse	250/200 nM probes
D	400nM primers forward 200nM primers reverse	200/150 nM probes

E	800nM primers forward 400nM primers reverse	200/150 nM probes
F	200nM primers forward 200nM primers reverse	400/300 nM probes
G	400nM primers forward 200nM primers reverse	400/300 nM probes

3.5.6 Variables

Las variables a considerar en el estudio se describen en la siguiente tabla:

Tabla 4. Variables independientes para el estudio de detección de *Batrachochytrium*

Operacionalización de las variables del estudio.

Variables	Tipo de variable	Definición	Indicador	Unidad de medida	Instrumento
Infección por Bd	Cualitativa/ Independiente	Quitridiomycosis	Presencia o Ausencia del ADN	Positivo o Negativo	Medición directa PCR
Infección por Bsal	Cualitativa/ Independiente	Quitridiomycosis	Presencia o Ausencia del ADN	Positivo o Negativo	Medición directa PCR
Especie de Anfibio	Cualitativa/ Independiente	Especie de Anfibio	% de animales afectados	# animales afectados	Medición directa PCR

3.5.7 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 25, para realizar la prueba de Fisher en las diferentes especies.

4. CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Diseño de Primers y Sondas

Las sondas y cebadores fueron diseñados en base a estudios publicados por lo cual se usaron regiones específicas de Bd y Bsal utilizando porciones de 146 y 180 pares de bases (pb) del espaciador transcrito interno y 5.8 genes ribosomales. Los cebadores y sondas fueron diseñados utilizando Primer-BLAST y Primer3web 4.1.0 (Tabla 4) y fueron evaluados para los dímeros y horquillas con Autodimer v1.0 y OligoAnalyzer V3.1.

Tabla 5. Secuencias de cebadores y sondas utilizadas en la PCR cuantitativa para la detección de Bd y Bsal

Patógeno	Nombre	Secuencia	Concentración	Referencia
Bsal	Bsal-ITS2-F	ATCTCCCCTCTTCATCCCTAA	400	Este estudio
	Bsal-5.8S-R	CATCGAATCTTTGAACGCACATTG	400	Este estudio
	Bs.5.8S-Probe	HEX-TGATTCTCAAACAGGCATACTCTAC-BHQ	250	Este estudio
Bd	ITS1-3 Chytr	CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC	800	Boyle (2004)
	Bd.5.8S-R	GCATTTGCTGCGTTCTTCA	400	Este estudio
	Bd-ITS1-Probe	FAM-TTGACAACGGATCTCTTGGCTGTCGCAA-BHQ	150	Este estudio

4.1.2 Control Positivo

Las regiones genómicas específicas para Bd y Bsal se sintetizaron en una única plantilla génica (gBlocks) para su uso como control positivo y estándar de cuantificación (Fig. 6). Para la detección de Bd y Bsal, porciones de 146 y 180

pares de bases (pb) del espaciador transcrito interno (ITS-1 e ITS-2) y 5.8 genes ribosomales fueron seleccionados como se describió previamente.

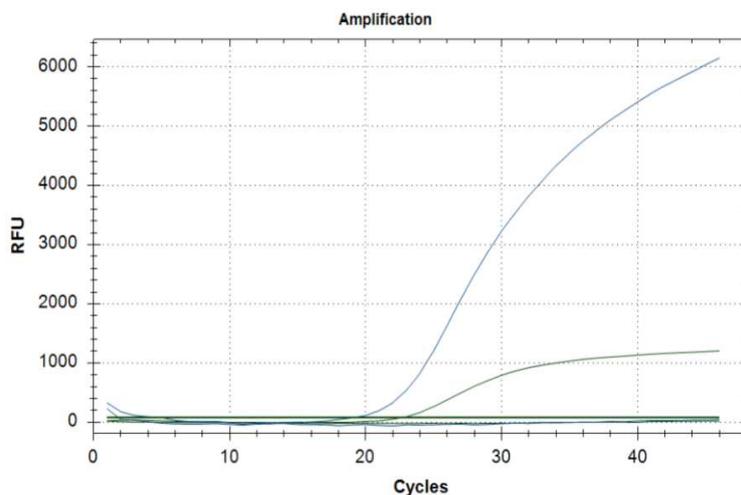


Figura 7. Amplificación de Bd muestras positivas.

4.1.3 Estandarización

Para realizar la estandarización efectiva se realizaron 8 pruebas evaluando los primers para Bd ITS1-3Chytr y Bd5.8S-R y la sonda Bd ITS1-Probe y para Bsal se utilizaron los primers Bsal ITS2-F y Bsal5.8S-R y la sonda Bsal 5.8S-Probe donde se usaron los siguientes reactivos: TaqMan Multiplex Master Mix (Applied Biosystems), GoTaqProbe qPCR Master Mix de 200 reacciones (Promega). Dando los siguientes resultados:

Tabla 6. Preparación del Mix (GoTaqProbe qPCR Master Mix)

Componente	Stock	Unidad	Dilución	Conc. Final	Vol X 1 (µl)
Master Mix	2	X	2	1	5,00
Sonda	2,5	uM	10	0,25	1,00
Forward	4	uM	10	0,4	1,00
Reverse	4	uM	10	0,4	1,00
ADN	1,00E+06	Copias	5	2,00E+05	2,00
Volumen Final Mix					8
Volumen Final De Reacción					10

Obteniendo un protocolo final con el reactivo más efectivo Promega para la PCR en tiempo real con las siguientes condiciones:

Tabla 7. Condiciones de Estandarización

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización	95°C	2 min	1
Desnaturalización	93°C	15 seg	45
Alineamiento/extensión	64°C (lectura)	1 min	

4.1.4 Curva Estandar

Para el análisis de la PCR en tiempo real se generó una curva estándar (Fig. 7) a partir de concentraciones diferentes del control positivo (gBlock) en un rango de $9,15 \times 10^5$ mol/ μ L como máxima concentración y 9,15 mol/ μ l como mínima concentración.

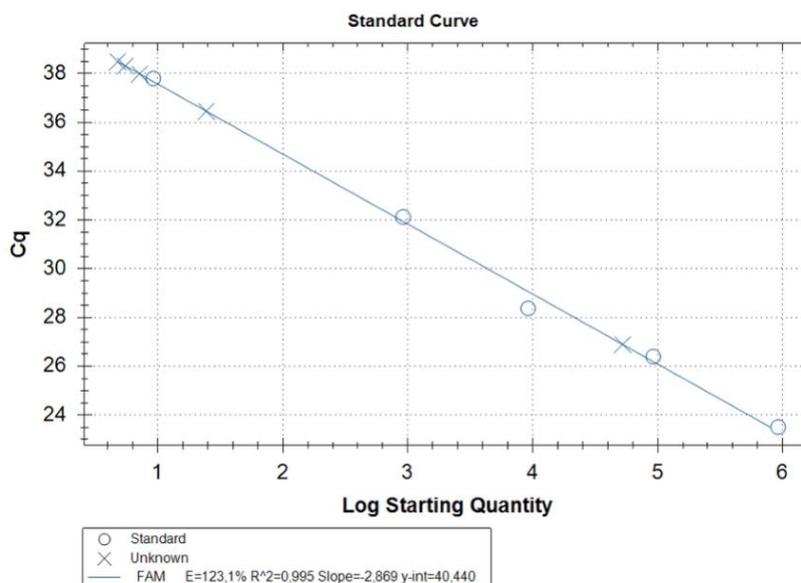


Figura 8. Curva estándar de PCR en tiempo real par Bd obtenido con diluciones en serie de 10 veces que muestran una alta correlación lineal (RSq = 0.995).

4.1.5 Resultados de Bd y Bsal

Una vez realizada la estandarización se obtuvieron los siguientes resultados de la PCR en tiempo real (Tabla 7) en base a las 126 muestras de 47 anfibios de los Centros de Conservación Vivarium y Jambatu

Tabla 8. Resultados del procesamiento de muestras de 47 anfibios para Bd y Bsal mediante la estandarización de PCR en tiempo real.

# Animales	Especie	Código del animal	Centro de Procedencia	BD	BSAL
1.	<i>Ambystoma mexicanum</i>	4040	Vivarium	+	-
2.	<i>Boana geographica</i>	3753	Vivarium	-	+
3.	<i>Boana pellucens</i>	3975	Vivarium	-	+
4.	<i>Espadarana audax</i>	4F634	Jambatu	-	-
5.	<i>Espadarana audax</i>	4F635	Jambatu	-	-
6.	<i>Espadarana audax</i>	4F637	Jambatu	-	-
7.	<i>Espadarana audax</i>	4F639	Jambatu	-	-
8.	<i>Espadarana audax</i>	4F640	Jambatu	-	-
9.	<i>Espadarana audax</i>	4F641	Jambatu	-	-
10.	<i>Espadarana audax</i>	4F642	Jambatu	-	-
11.	<i>Espadarana audax</i>	4F643	Jambatu	-	-
12.	<i>Espadarana audax</i>	4F654	Jambatu	+	-
13.	<i>Espadarana audax</i>	4F658	Jambatu	-	-
14.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	CJ10078	Jambatu	-	-
15.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	IF667	Jambatu	-	+
16.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	UF611	Jambatu	-	-
17.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	UF633	Jambatu	+	-
18.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	UF661	Jambatu	-	-
19.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	UF662	Jambatu	-	-
20.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	UF663	Jambatu	-	-
21.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	UF665	Jambatu	-	-

22.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	UF671	Jambatu	+	-
23.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	UF673	Jambatu	-	-
24.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	UF678	Jambatu	-	-
25.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	UF679	Jambatu	-	-
26.	<i>Gastrotheca orophylax</i>	UF681	Jambatu	-	-
27.	<i>Gastrotheca pseustes</i>	4F671	Jambatu	-	-
28.	<i>Gastrotheca riobambae</i>	4011	Vivarium	+	+
29.	<i>Gastrotheca riobambae</i>	4053-2	Vivarium	-	-
30.	<i>Gastrotheca riobambae</i>	3789	Vivarium	+	+
31.	<i>Gastrotheca riobambae</i>	3852	Vivarium	+	-
32.	<i>Gastrotheca riobambae</i>	3853	Vivarium	+	+
33.	<i>Gastrotheca riobambae</i>	3854	Vivarium	+	-
34.	<i>Gastrotheca riobambae</i>	3855	Vivarium	+	-
35.	<i>Gastrotheca riobambae</i>	3857	Vivarium	+	+
36.	<i>Hyloscirtus phyllognathus</i>	4F655	Jambatu	-	-
37.	<i>Hyloscirtus phyllognathus</i>	4F656	Jambatu	-	-
38.	<i>Hyloscirtus alytolylax</i>	3968	Vivarium	+	+
39.	<i>Hyloxalus bocagei</i>	4F651	Jambatu	-	-
40.	<i>Hyloxalus bocagei</i>	4F652	Jambatu	-	-
41.	<i>Osteocephalus verruciger</i>	4F653	Jambatu	+	-
42.	<i>Pristimantis sp</i>	4F632	Jambatu	-	-
43.	<i>Pristimantis sp</i>	4F644	Jambatu	+	-
44.	<i>Pristimantis sp</i>	4F645	Jambatu	-	-
45.	<i>Pristimantis sp</i>	4F646	Jambatu	-	-
46.	<i>Pristimantis sp</i>	4F648	Jambatu	-	+
47.	<i>Pristimantis sp</i>	4F650	Jambatu	-	-

4.1.6 Frecuencia de infección por Bd y Bsal

Se hallaron 14 anfibios positivos para Bd y 9 anfibios positivos para Bsal, lo que indica que Bd sigue presente en distintos anuros de centros de conservación de la ciudad de Quito.

Uno de los principales hallazgos en este estudio es la presencia de Bsal ya que no se han encontrado investigaciones que confirmen la presencia de este hongo en América del Sur.

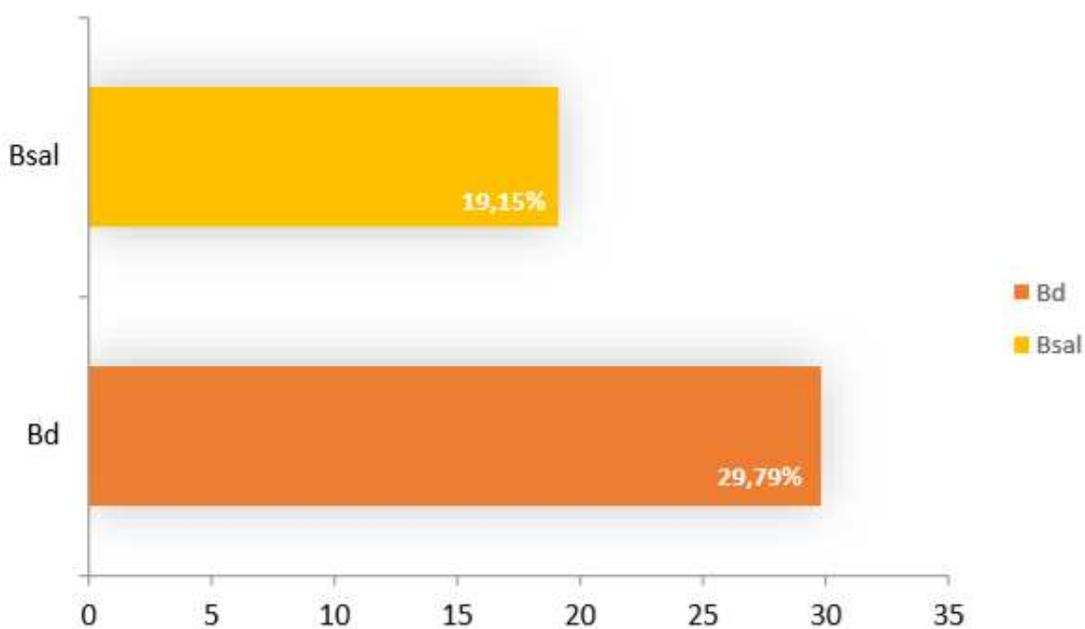


Figura 9. Frecuencia de infección por Bd y Bsal en los centros de conservación de anfibios.

4.1.7 Frecuencia de la infección por Bd y Bsal en los centros de conservación Vivarium y Jambatu

Los resultados obtenidos señalan que el centro con mayores individuos infectados es Vivarium de Quito (Fig. 9) obteniendo el 75% (9/12) de frecuencia de infección de Bd y el 41,6% (5/12) de Bsal. Mientras que el centro de conservación Jambatu presento el 14,3% (5/35) de infección con Bd y 5,7% (2/35) de Bsal.

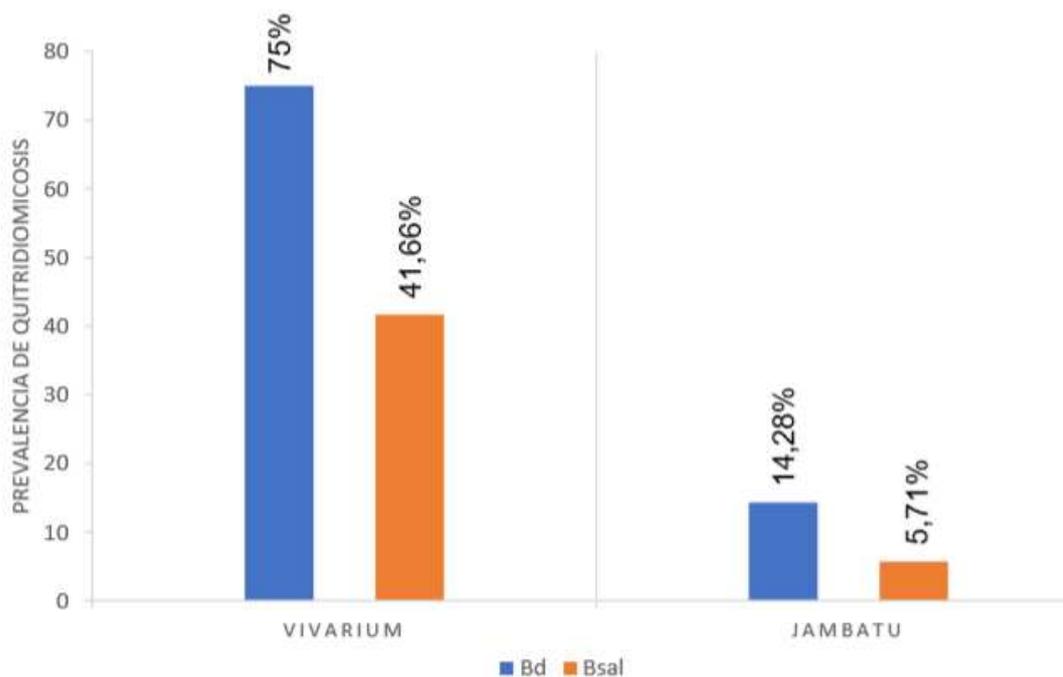


Figura 10. Frecuencia de quitridiomycosis en los centros de conservación de anfibios

4.1.8 Frecuencia de infección y coinfección por Bd y Bsal en las distintas especies de anfibios

La especie de anfibio más afectada fue *Gastrotheca riobambae* proveniente del Centro Vivarium obteniendo una tasa de infección de Bd del 50% (Fig. 10) y 45% con Bsal (Fig.11). Se sabe que esta especie habita en laderas rocosas y zonas montañosas húmedas en la vegetación de los bosques, encontrándose alrededor de los valles del Ecuador principalmente en las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo (Chasiluisa, V. et al., 2020). Esta especie se adapta a los cambios de hábitat encontrándose en áreas disturbadas.

Otra de las especies más afectadas fue *Gastrotheca orophylax* proveniente del Centro Jambatu quién tuvo una tasa de infección del 15% con Bd (Fig. 10) y el 11% con Bsal (Fig. 11). Esta especie se encuentra comúnmente en los bosques y áreas de cultivos en la Cordillera Oriental de los Andes del Ecuador (Chasiluisa, V. et al., 2020).

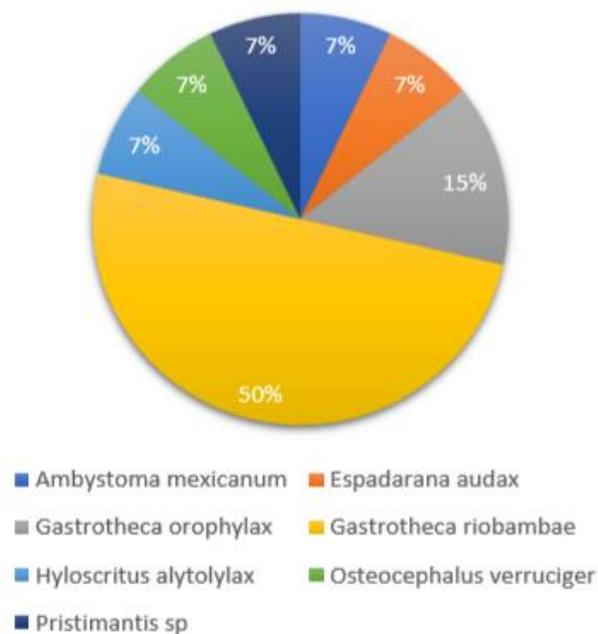


Figura 11. Distribución de anfibios infectados por Bd según la especie

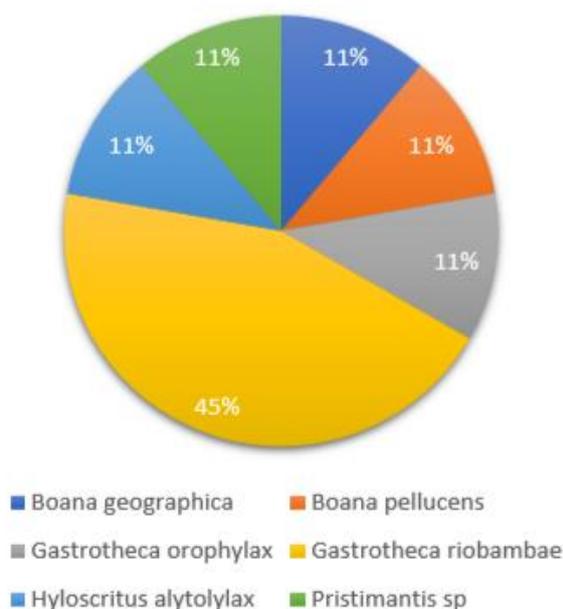


Figura 12. Distribución de anfibios infectados por Bsal según la especie

Entre los resultados obtenidos se halló una especie exótica *Ambystoma mexicanum* positivo para Bd (Tabla 8). Por otro lado, se encontraron dos especies presentando coinfección *Hyloscirtus alytolylax* proveniente del Centro Jambatu y *Gastrotheca riobambae* proveniente del Centro Vivarium.

Tabla 9. Infección y coinfección de *Batrachochytrium dendrobatidis* y *Batrachochytrium salamandrivorans* en las distintas especies de anfibios

Especie	Positivo Bd	Positivo Bsal	Coinfección	Negativo	Total
<i>Ambystoma mexicanum</i>	1	0	0	0	1
<i>Boana geographica</i>	0	1	0	0	1
<i>Boana pellucens</i>	0	1	0	0	1
<i>Espadarana audax</i>	1	0	0	9	10
<i>Gastrotheca orophylax</i>	2	1	0	10	13
<i>Gastrotheca psesutes</i>	0	0	0	0	1
<i>Gastrotheca riobambae</i>	7	4	4	1	8
<i>Hyloscirtus phyllognathus</i>	0	0	0	2	2

<i>Hyloscirtus alytolylax</i>	1	1	1	1	1
<i>Hyloxalus bocagei</i>	0	0	0	2	2
<i>Osteocephalus verruciger</i>	1	0	0	0	1
<i>Pristimantis sp</i>	1	1	0	4	6
	14	9	5	29	47

Al presentar varias especies con un solo ejemplar (Fig. 12) se obtuvo una frecuencia de infección del 100% con Bd y Bsal, a diferencia de *Gastrotheca riobambae* la cual obtuvo 87,5% de infección con Bd y 50% con Bsal presentando (7/8) animales positivos.

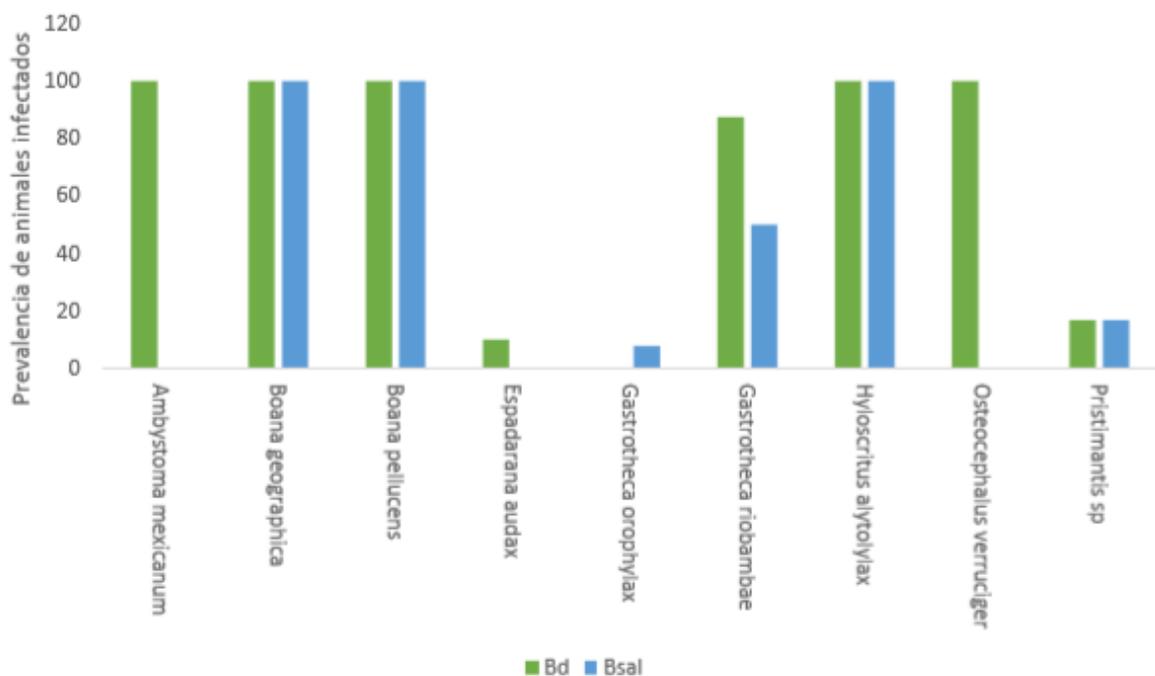


Figura 13. Frecuencia de infección por Bd y Bsal en las diferentes especies de anfibios

4.1.9 Análisis Estadístico

Dentro del estudio estadístico se realizó el Test de Fisher entre cada especie y no se encontraron diferencias significativas, en consecuencia, no se pudo verificar si una especie en particular es más predisponente a presentar la infección. Este resultado se puede relacionar con la cantidad de animales muestreados por especie.

Las siguientes tablas son un ejemplar del test realizado para la evaluación de la diferencia de frecuencia de infección por Bd y Bsal obteniendo como resultado $p=0.602$ para Bd y $p=0.565$ para Bsal entre las especies *Gastrotheca orophylax* y *Espadarana audax*.

Tabla 10. Prueba de Fisher para Bd entre *Gastrotheca orophylax* y *Espadarana audax* del Centro Jambatu

Especie * Bd

Tabla cruzada

Recuento		Bd		Total
		-	+	
Especie	<i>Espadarana audax</i>	9	1	10
	<i>Gastrotheca orophylax</i>	11	2	13
Total		20	3	23

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,144 ^a	1	,704		
Corrección de continuidad ^b	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,148	1	,701		
Prueba exacta de Fisher				1,000	,602
N de casos válidos	23				

a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,30.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Tabla 11. Prueba de Fisher para Bsa entre *Gastrotheca orophylax* y *Esparadana audax* del Centro Jambatu

Especie * Bsal

Tabla cruzada

Recuento		Bsal		Total
		-	+	
Especie	<i>Esparadana audax</i>	10	0	10
	<i>Gastrotheca orophylax</i>	12	1	13
Total		22	1	23

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,804 ^a	1	,370		
Corrección de continuidad ^b	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	1,176	1	,278		
Prueba exacta de Fisher				1,000	,565
N de casos válidos	23				

a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,43.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

4.1.10 Discusión

En base a los resultados hallados se pudo evidenciar que entre los dos centros de conservación hay una frecuencia por Bd del 30%. Obteniendo una diferencia del 61% Vivarium presento la mayor frecuencia de infección, la presente variación puede deberse al tipo de muestreo que se utilizó en cada centro de conservación, en Vivarium se trabajó con animales enfermos que presentaban lesiones compatibles con la infección, mientras que en Jambatu se trabajó con animales aparentemente sanos provenientes de campo que fueron escogidos aleatoriamente. Hyatt (2007) reporta un mayor nivel de infección en aquellas muestras provenientes de tejido (> #zoosporas), y por otro lado menciona que se puede obtener un bajo número de individuos positivos en aquellos ejemplares

que posiblemente se encuentran en etapas iniciales de la enfermedad y no se evidencia síntomas, o por el exceso de ecdisis cuando ya se ha presentado la infección.

También se puede mencionar que al obtener tejido directamente de los anfibios enfermos se pudo recuperar de manera más fácil y directa el ADN mientras que al obtener los hisopados se pueden presentar distintos problemas que pueden causar la inhibición de la PCR (Ballagi-Pordany & Belak, 1996) como la sanidad del hisopo que puede llegar a presentar cualquier material extraño como detritos. Los resultados obtenidos también se pueden ver influenciados por la superficie del individuo a analizar o la etapa de vida en la que el quítrido se encuentre ya que en estadios tempranos de la infección hay menos probabilidad de detección del hongo por hisopado, y en consecuencia la frecuencia es menor como lo menciona el estudio de Narváez (2014) quien realizó una investigación en las especies *Gastrotheca riobambae* y *Pristimantis unistrigatus* en el Parque Metropolitano Guanguiltagua de Quito comparando PCR punto final y qPCR para la detección de Bd (Narváez. 2014).

Por otro lado, se pudo encontrar que la mayor especie afectada fue *Gastrotheca riobambae* obteniendo el 50% de frecuencia en este estudio a comparación de Narváez (2014) que reporta el 39% esta variación puede presentarse debido a los distintos estadios de vida de los anfibios que fueron estudiados, en esta investigación se utilizaron adultos y Narváez uso renacuajos de la misma especie utilizando la misma técnica de PCR cuantitativa con lo que se puede suponer que aquellos anfibios que se encuentran en etapas adultas presentarían mayor nivel de zoosporas en la piel, mientras que en los renacuajos solo puede detectar la infección mediante tejido del aparato bucal. Estos resultados son aparentes ya que en el análisis estadístico no se pudieron obtener datos por el número de individuos.

Al realizar esta investigación se obtuvo un hallazgo importante un Ajolote (*Ambystoma Mexicanum*) especie exótica quien dio positivo para Bd (Tabla 8) este anfibio fue decomisado, por lo cual se desconoce si el animal llegó portando la enfermedad o fue contagiado en el centro donde se lo mantuvo en cuarentena, como se menciona en el estudio de Fisher (2020) el Bd ha venido atacando al 55% de las especies de salamandras y tritones creando un rango inigualable de huéspedes patógenos.

Es importante recalcar que de acuerdo al estudio Bsal se encuentra con el 19,15% de frecuencia en los centros de conservación de anfibios por lo que se puede suponer que está presente en el país ya que algunos de los animales muestreados provenían de campo. Este es uno de los primeros estudios confirmados de Bsal en países latinos debido a que en las distintas investigaciones mencionan la presencia de este hongo en América del Norte en EEUU y México como los principales países portadores de salamandras y susceptibles para contraer la infección. Es importante realizar más estudios para confirmar la presencia del hongo, mediante otros métodos diagnósticos.

Se puede evidenciar resultados de una coinfección quítrida en las distintas especies de anfibios (Tabla 8). Mediante investigaciones recientes se determinó que puede ocurrir este fenómeno entre las dos especies de *Batrachochytrium* o con los distintos linajes del mismo (McDonald, Longo, Lips, & Zamudio, 2020), lo que indica que mientras Bsal se vaya propagando a nivel mundial irá encontrando poblaciones de anfibios ya infectados con Bd. No se conoce cuáles son los efectos cuando estos dos hongos interactúan sobre la inmunidad del huésped. Por lo cual se debe tener en claro que los perfiles patogénicos de Bd y Bsal son distintos.

Narváez (2014) menciona que los anfibios han ido experimentando decesos en poblaciones debido a varias causas como sobreexplotación de sus hábitats,

lluvias ácidas, cambios climáticos, aumento de la radiación UV, introducción de especies, contaminación, pesticidas, comercio ilegal, y sobre todo enfermedades de distintos patógenos (Narváez, 2014). Entre los principales patógenos que representan un riesgo potencial para los anfibios se encuentra el hongo *Batrachochytrium* causando la quitridiomycosis y por otro lado en las distintas investigaciones se ha detectado una enfermedad viral, siendo una investigación paralela a este estudio el *Ranavirus*, siendo estas enfermedades las causantes de extinciones y pérdidas de poblaciones de anfibios (Oie, 2011).

El diseño y estandarización de los ensayos de PCR en tiempo real se basaron en parámetros para amplificar ADN de Bd y Bsal obteniendo resultados positivos. En los diferentes ensayos que se realizaron se llevó a cabo una duplex para Bsal y Ranavirus como parte del estudio y se pudo evidenciar que funcionan conjuntamente como método de detección rápido y eficiente para estos patógenos, siendo un gran avance para las investigaciones de estas enfermedades. Se conoce que es el primer sistema multiplex desarrollado en Ecuador permitiendo tener una herramienta valiosa para la detección temprana de patógenos de anfibios la cual permitirá el monitoreo de infecciones en la vigilancia epidemiológica futura de especies de anfibios en riesgo de extinción.

4.1.11 Limitantes

Uno de los mayores factores limitantes para obtener la frecuencia de la enfermedad entre los dos centros de conservación fue el tiempo y el tipo de muestras que se utilizaron por lo que no se pueden obtener datos específicos como ya se mencionó en el centro Vivarium se utilizaron animales enfermos que presentaban lesiones compatibles con la enfermedad, mientras que en Jambatu se escogieron animales al azar (sanos y enfermos) que vinieron de campo arrojando distintos resultados.

Otro factor importante fue la limitada cantidad de ejemplares que se procesaron en el estudio por lo cual no se pudo observar las diferencias de susceptibilidad entre las especies.

Al obtener animales únicamente de centros de conservación no se puede confirmar la presencia de Bsal en todo el territorio ecuatoriano, estos son resultados preliminares que pueden ayudar realizar investigaciones a nivel de campo, para conocer la distribución y el daño que está causando este patógeno.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El diseño y estandarización de los ensayos de PCR en tiempo real arrojaron resultados rápidos, en bajos recursos y confiables, se determina que esta es una herramienta diagnóstica que ayudara a la detección de quitridiomycosis en poblaciones de anfibios siendo una de las técnicas con mayor sensibilidad y especificidad.

Se pudo confirmar que aún existe la presencia de Bd en los distintos centros de conservación, con una frecuencia del 75% en Vivarium de Quito. Siendo un centro abierto al público es un lugar de riesgo, puede existir contaminación cruzada por la circulación de personas, acogimiento de animales incautados y por el hecho de encontrarse ubicado en el Parque La Carolina en una de las zonas con mayor biodiversidad de anfibios a su alrededor y está cerca del Parque Metropolitano Guangüiltagua el cual también es un foco de infección.

El presente estudio reporta por primera vez la presencia de Bsal en anfibios de los distintos centros de conservación de Quito. Por lo cual se puede suponer que el quítrido se encuentra en América del Sur ya que solo se lo ha reportado en América del Norte.

Para este estudio, por las características de las muestras, no se encontró una relación estadísticamente significativa entre el promedio de infección y la frecuencia de la enfermedad entre las especies estudiadas.

5.2 Recomendaciones

Es recomendable utilizar PCR en tiempo real como método diagnóstico al ser una de las herramientas más sensibles y eficaz para la detección de este quítrido en futuras investigaciones, así se podrá eliminar posibles resultados falsos positivos y falsos negativos.

En futuras investigaciones se recomienda utilizar técnicas de detección adicionales para confirmar los resultados como en el caso de la PCR punto final que es otra herramienta útil para detectar quitridiomycosis.

Al momento del muestreo es recomendable escoger animales con los mismos criterios en este caso de una población determinada o aquellos que se encuentren presentando lesiones compatibles para evitar sesgo de información.

Se debe continuar con las investigaciones de la presencia de Bsal con anfibios de campo y aquellos que ingresen mediante biocomercio legal en los distintos lugares del Ecuador para confirmar que la infección se encuentra presente en todo el país.

REFERENCIAS

- Aguilera, P., Ruiz Tachiquín, M., Rocha Munive, M. G., Pineda Olvera, B., Chánez Cárdenas, M. E., & Chain, P. (2015). Herramientas moleculares aplicadas en ecología. PCR en tiempo real. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología*, 13(3), 175–202. Retrieved from <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf>
- amphibiaweb.org. (14 de enero de 2020). *amphibiaweb.org*. Obtenido de [amphibiaweb.org: https://amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html](https://amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html)
- Asamblea de delegados World Organisation for Animal Health. (2012). Capitulo 2.1.1 Infección por *Batrachochytrium Dendrobatidis*. *Manual Acuatico de La World Organisation for Animal Health, CAPITULO 2*, 1–22.
- Ballagi-Pordany, A., y Belak, S. 1996. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 10, 159-164.
- Barrera Cubillos, G. P., Murcia, J., Cerón Pérez, J. L., Cuartas Otálora, P. E., Guzmán Santofimio, C. A., & Villamizar, L. F. (2016). PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 24. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61514>
- Berger, L., Hyatt, A. D., Olsen, V., Hengstberger, S. G., Boyle, D., Marantelli, G., Humphreys, K., y Longcore, J. E 2002. Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48, 213 - 220.
- BIOWEB. (19 de marzo de 2019). *BIOWEB*. Obtenido de BIOWEB: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/DiversidadBiogeografia>
- Blooi, M., Pasmans, F., Longcore, J. E., Spitzen-Van Der Sluijs, A., Vercammen, F., & Martel, A. (2013). Duplex real-Time PCR for rapid simultaneous

- detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 4173–4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.02313-13>
- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A. T., & Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60(2), 141–148. <https://doi.org/10.3354/dao060141>
- Braja, D. (2012). Estructuración genética de muestras del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* en Ecuador (Vol. 66).
- Burgos, German & Narváez-Narváez, D.A. & Freire, Byron & Merino-Viteri, A. & Muslin, C. & Genoy-Puerto, Alexander. (2019). Development of a multiplex real-time PCR surveillance assay for monitoring the health status of Ecuadorian amphibians at risk of extinction. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 10.1016/j.fsigss.2019.10.134.
- CABI. (22 de noviembre de 2019). Compendio de especies Invasoras. Obtenido de Compendio de especies Invasoras: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/120547#tosummaryOfInvasiveness>
- Cantera, X. (2015). *Nota de prensa : Un hongo letal procedente de Asia amenaza a las salamandras y los tritones europeos Un hongo letal procedente de Asia amenaza a las salamandras y los tritones europeos*. (October 2014), 1–3.
- Chasiluisa, V., Frenkel, C., Vallejo, A., Félix-Novoa, C. y Ron, S. R. 2020. *Gastrotheca riobambae* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). Anfibios del Ecuador. Version 2019.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Gastrotheca%20riobambae>, acceso miércoles, 10 de Junio de 2020
- Chasiluisa, V., Coloma, L. A., Frenkel, C. y Felix-Novoa, C. 2018. *Gastrotheca orophylax* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). Anfibios del Ecuador. Version 2019.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad

Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Gastrotheca%20orophylax>, acceso jueves, 18 de Junio de 2020

Climate-data.org. (15 de diciembre de 2019). *Climate-data.org*. Obtenido de Climate-data.org: <https://es.climate-data.org/america-del-sur/ecuador/provincia-de-pichincha/quito-1012/>

Coloma, L. 1995. Ecuadorian frogs of the genus *Colostethus* (Anura: Dendrobatidae). *Miscellaneous Publications of the Natural History Museum, Univ. of Kansas*, (87), 1-72.

Crawford, A. J. (31 de mayo de 2009). Anfibios estan en riesgo por presencia de hongo quítrido. *El Universo*.

el telégrafo. (30 de julio de 2019). el telégrafo. Obtenido de el telégrafo: <https://www.entelegrafo.com.ec/noticias/sociedad/6/especies-rana-toroecuador-anfibio-hongo>

EQUIPO SOS ANFIBIOS GUADARRAMA. (27 de noviembre de 2015). *Parque Nacional Sierra de Guadarrama*. Obtenido de Parque Nacional Sierra de Guadarrama: <https://www.parquenacionalsierraguadarrama.es/es/blogs/sos-anfibios/item/108-blog-sos-anfibios-50>

Farrer, R. A. (2019). *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Trends in Microbiology*, 27(10), 892–893. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.04.009>.

Fisher, M. C., & Garner, T. W. J. (2020). Chytrid fungi and global amphibian declines. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 332–343. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0335-x>

Flores, G. (7 de abril de 2019). elcomercio. Obtenido de elcomercio: <https://www.elcomercio.com/tendencias/pandemia-afecta-especiesanfibios-pais.html>

Freire, D., Fernández, C., & Nogales, F. (2006). Analysis of the presence of the fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* Bd. in the Amphibian populations of 8 localities in the southern Ecuadorian Andes. *Lyonia*, 9(1), 7–18. Retrieved

from http://www.lyonia.org/articles/rbusmann/article_393/pdf/article.pdf

Global Bd- Mapping Project. (14 de octubre de 2019). bd-maps.net. Obtenido de [bd-maps.net: http://www.bd-maps.net/maps/](http://www.bd-maps.net/maps/)

Gray MJ, Lewis JP, Nanjappa P, Klocke B, Pasmans F, Martel A, et al. (2015) *Batrachochytrium salamandrivorans*: The North American Response and a Call for Action. *PLoS Pathog* 11(12): e1005251. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005251>

Guest, P. C. (Ed. . (2017). Multiplex Biomarker Techniques. *Methods in Molecular Biology*, 1546, 317 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8>

Hyatt, A. D., Boyle, D. G., Olsen V., Boyle D. B., Berger, L., Obendorf, D., Dalston, A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F., y Coiling, A. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73, 175-92.

IUCN. (30 de mayo de 2020). *The IUCN Red List of Treatedened Species*. Obtenido de The IUCN Red List of Treatedened Species: <https://www.iucnredlist.org/>

Informativo, A. B., Stark, T., Martel, A., Pasmans, F., Thomas, V., Gilbert, M., & Spitzen, A. (2018). para las salamandras. 12–14.

IUCN. (30 de mayo de 2020). *The IUCN Red List of Treatedened Species*. Obtenido de The IUCN Red List of Treatedened Species: <https://www.iucnredlist.org/>

Lowe S., B. M. (2004). 100 DE LAS ESPECIES EXÓTICAS INVASORAS MÁS DAÑINAS DEL MUNDO (Primera edición ed.). (V. T. Actualizada, Trad.) Grupo Especialista de Especies Invasoras.

Hammer, R., Ronen, M., & Kohen-Vacs, D. (2010). Stressed yet Motivated: Web-based peer assessed competition as an instructional approach in higher education. *Learning in the Disciplines: ICLS 2010 Conference Proceedings - 9th International Conference of the Learning Sciences*, 1, 65–72.

- Martel, A., & Martel, A. (2017). *Batrachochytrium salamandrivorans* A. Martel, 2013. 1–8.
- McDonald, C. A., Longo, A. V., Lips, K. R., & Zamudio, K. R. (2020). Incapacitating effects of fungal coinfection in a novel pathogen system. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/mec.15452>
- M.R. Green, J. Sambrook, Isolation of high-molecular-weight DNA using organic solvents, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2017 (2017) 356–359. doi:10.1101/pdb.prot093450.
- Mendoza-Almeralla, C., Burrowes, P., & Parra-Olea, G. (2015). La quitridiomycosis en los anfibios de México: Una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(1), 238–248. <https://doi.org/10.7550/rmb.42588>
- Muletz, C. R., Myers, J. M., Domangue, R. J., Herrick, J. B., & Harris, R. N. (2012). Soil bioaugmentation with amphibian cutaneous bacteria protects amphibian hosts from infection by *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Biological Conservation*, 152, 119–126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.03.022>
- Narváez, D. A. (2014). *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. Obtenido de Pontificia Universidad Católica del Ecuador: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/8683>
- O'Hanlon, S. J., Rieux, A., Farrer, R. A., Rosa, G. M., Waldman, B., Bataille, A., ... Fisher, M. C. (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360(6389), 621–627. <https://doi.org/10.1126/science.aar1965>
- Oie. (2011). Infección por Ranavirus. *Manual de Pruebas de Diagnóstico Para Los Animales Acuáticos*
- Ramirez, M. (2013). Deteccion de B. dentronbatidis. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ron, S. R., Duellman, W. E., Coloma, L. A., y Bustamante, M. R. 2003. Population

decline of the Jambato toad *Atelopus ignedcens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology*, 37 (1), 116-126.

Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Canessa, S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434), 1459–1463. <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>

Velasquez, A. V., (2014). Dinámica Estacional de la Infección por el Hongo Quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* en una Población de Salamandras de la Especie *Pseudoeurycea*. *Universidad Nacional Autónoma de México. Bachelor's Thesis*, 1–47. Retrieved from https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis_lopez_velazquez.pdf

Weldon, C., Preez, L. H., Hyatt, A. D., Muller, R., & Speare, R. (2004). *Weldon2004*. 10(12), 2100–2105.

Zuazo, A. V. (19 de mayo de 2019). MONGABAY. Obtenido de MONGABAY: <https://es.mongabay.com/2019/05/ecuador-anfibios-herpetologoconservacion/>

ANEXOS

Anexo 1

Toma de muestra mediante hisopado de piel



Anexo 2

Recolección de muestras en Centro Jambatu



Anexo 3

Toma de muestra de tejido de cavidad del Centro Vivarium



Anexo 4

Gastrotheca Riobambae

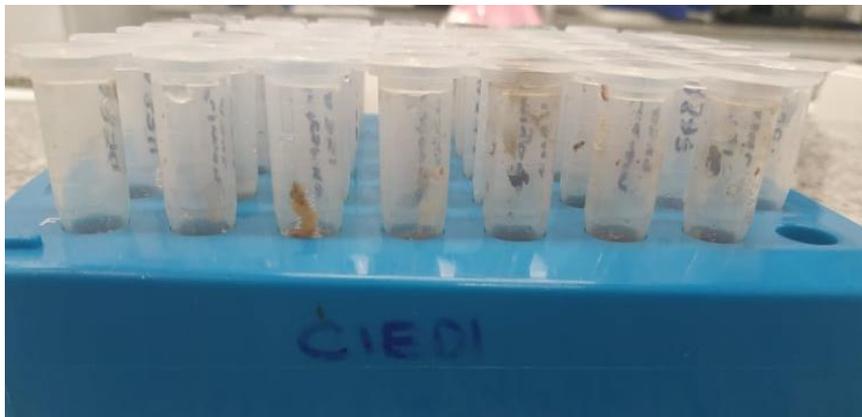


Anexo 5

Gastrotheca pseustes

Anexo 6

Muestras para extracción de ADN



Anexo 7

Factores que intervienen en la propagación del Hongo *Batrachochytrium*. Tomado de Fisher & Garner., 2020.

