



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

**SUSCEPTIBILIDAD DE LA RANITA MERIDEÑA,
Dendropsophus meridensis, A INFECCIONES
EXPERIMENTALES CON EL HONGO *Batrachochytrium
dendrobatidis***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por el Bachiller **Villarroel Rivas, Leomar José**, como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor (es): Dra. Margarita Lampo

Dr. Juan Carlos Navarro.

CARACAS, VENEZUELA

Octubre, 2011

RESUMEN.

La quitridiomycosis es una infección cutánea en anfibios producida por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) que se ha asociado con muertes masivas y extinciones de anuros a nivel mundial. Sin embargo, no todas las especies desarrollan la enfermedad letal y algunas son resistentes. En Venezuela se han detectado zoosporas de *Bd* en ejemplares de museos y ranas silvestres vivas. La ranita merideña (*Dendropsophus meridensis*), es una especie endémica de los Andes venezolanos en peligro de extinción, en cuyas poblaciones se ha encontrado el hongo. Para evaluar la susceptibilidad de esta especie ante *Bd*, llevamos a cabo infecciones experimentales en individuos post metamórficos. Tomamos muestras cada seis días durante 66 días con el fin de determinar cómo cambia la intensidad de la infección, a partir de la cuantificación de las zoosporas con ensayos de PCR a tiempo real. Encontramos una dependencia de la mortalidad con la exposición a zoosporas del hongo. 59% de los individuos infectados murieron durante el ensayo mientras que no se registraron decesos en los controles. Esto indica que la presencia de *Bd* en poblaciones silvestres podría representar una amenaza para esta especie. Por otra parte observamos una disminución espontánea de la infección en los animales sobrevivientes expuestos, detectándose la infección en solo uno de los nueve sobrevivientes.

Dedicatoria

*A Vic
A mis padres
A mis hermanos*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios.

Agradezco a mis padres, Gloria y Omar. Por nunca haber perdido la fe. Y por siempre esperar que este gran momento llegara. Por enseñarme que el esfuerzo y sacrificio lo puede todo, y que con las raíces más humildes se construyen bases solidas de una familia. Los amo y esto es por y para ustedes.

A mis hermanos, Omar y Otsmar. Porque han sido y son un ejemplo a seguir. Ejemplo de que se pueden lograr las cosas, porque al final los tres partimos del mismo punto. Por haber compartido tantos años y experiencias juntas y por, aun a estas alturas, seguirme tratando como ese hermano menor de hace 20 años atrás.

A Vic, por animarme dentro de tu inocencia. Por sonreír, llamarme, bailar, jugar y simplemente ser lo que eres y demostrarme que los problemas se quedan fuera de la casa cuando estás en ella, y que la vida es mucha más que un mal día de clases. Que por una sonrisa o un gesto vale la pena despertar cada mañana.

A mis abuelas Flor y Malena; a mis tíos Carlos y Luisa, Eduardo y Josefina, Flor y Freddy, Freddy Villarroel, Cucho, la Nena, Octavio y sobre todo mi tía Janeth. Mis primos Carlucho, Eduardo, Efraín, Carolina, Freddy, José Enrique, Carlos, Aquiles, Milagros, Erich, María y mi ahijada Bárbara. Los recuerdos familiares más gratos de mi vida son obra de ustedes. Y me alegra y estimula ver como hemos surgido y ampliado la familia.

A Zu. Las palabras de agradecimiento pudieran ser pocas. Como siempre he dicho de no ser por ti estaría viendo fisicoquímica aun. Esa vez me hiciste entender que era yo quien me frenaba y era yo quien debía salir de allí. Mas allá de eso agradecer todas las experiencias, oportunidades, hechos y sueños que juntos hemos vivido y viviremos. Créeme que de ti he aprendido mucho estos últimos dos años. El mejor ejemplo de fortaleza ante las adversidades. Y gracias por soportar estas semanas de estrés insistiendo que pronto acabaría. Gracias por dejarme estar en tu vida y ser parte de la mía.

A mis cuñadas: Angelica y Monica. Gracias por tanto tiempo compartiendo cosas lindas. Y por enseñarme, como mis hermanos, que es cuestión de querer algo para tenerlo.

A mis amigos “que les robe” a mi hermano: Ricky, David, Jaime, Chucky, Rodolfo. Gracias por tantos años de poker, hattrick, juegos, cenas navideñas y pare de contar. Y que sigan contando.

A quienes conocí cuando empecé en la escuela de Biología, y que aun hoy están ahí, y a quienes conocí en el trayecto, quienes no sé si me han hecho el

camino más fácil, pero si más llevadero: Antonio, Carlitos, Vane, Max, Igor, Dan, Xime, Grace, Luisa, Luisana.

A Lorena Sanchez y a Daniela Cavalieri. Grandes amistades que han logrado sobrevivir años, y que a pesar pasan épocas sin siquiera hablar, cada conversación sigue como la última vez que hablamos.

A muchos compañeros de "lucha" en biología y matemática y de los pasillos y la plaza, que durante tiempo hemos compartido grandes años: Joel, Walter, Neba, Wini, Mario, Carla, Ricky Soto, Mónica, Guitian, Juan Carlos, Eduardo, Emilio, Alexis, Manolo, Julieta, Ale García, Daniela y todos aquellos que se me hayan podido olvidar.

A la familia Luna: Irma, Zuri, Oscar, Semi, Simo, Bebe, Marlene, Sam, Seb, José Luis, José, Henry y flia., Simón y flia., Oswaldo y flia., por hacerme sentir parte de su familia y tratarme como un hijo-hermano-primo-sobrino mas.

A la familia Lugo- Ramirez: por años de mi juventud compartidos junto a ellos: Oriana, Gladys, Cesar, Ashley, Olguita y demás miembros. Gracias por toda la ayuda brindada y por el cariño recibido de cada uno de ustedes.

A la Dra Lampo, por aceptarme en su laboratorio y por la ayuda brindada.

A Carmen. Son pocas las veces que puedo agradecerte para lo que te mereces. Gracias por toda la guía, paciencia, orientación y convivencia prestada durante el proyecto. Espero hayas obtenido aunque sea una parte de lo mucho que recibí de ti. Que Dios bendiga a tu familia.

A Fran. Muchísimas gracias por el apoyo en las salidas y en todas las cuestiones técnicas. Gracias por la paciencia y colaboración cada vez que necesitaba algo. Y por esas charlas amenas en el laboratorio y en Mérida. Gracias por la disposición mostrada.

A Juan Carlos y Cesar por haberme ayudado, sobre todo durante las últimas semanas. Haberse leído el seminario dos sobre la carrera y aportar ideas que enriquecieron no solo el proyecto si no a mí como estudiante. Adicionalmente por establecer un dialogo más personal que profesional, lo cual facilita mucho las cosas a la hora de trabajar juntos. Al profesor Blas Dorta por la ayuda ofrecida durante la tesis.

A la profesora Marcia Toro por toda la ayuda brindada durante toda la carrera, pero sobre todo por la paciencia demostrada. A las profesoras Lourdes Suarez y Aura Falco; los profesores Unai Emaldi, Orannys Marin, Ernesto Gonzalez con quienes la brecha profesor-alumno se rompió, y demostraron que ustedes fueron estudiantes y vivieron lo que uno vivió y siempre han tenido la puerta abierta para una tertulia interesante.

A todos aquellos de profesores y preparadores, desde el colegio hasta la facultad, quienes me enseñaron no solo académicamente, sino personalmente, tanto en lo que se debe hacer como en lo que no, para ser un buen profesional.

A Fernando Rojas por la colaboración prestada para la salida de campo y los buenos ratos compartidos durante la misma.

A Betty, la secretaria de la escuela, quien a diferencia de mucho personal de atención al público, siempre se mostro atenta, amable y dispuesta a ayudar a los problemas que uno presentaba.

	PAG.
ÍNDICE GENERAL.	
ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
1. INTRODUCCIÓN	11
2. OBJETIVOS	
2.1 General	17
2.2 Especifico	17
3. ANTECEDENTES	
3.1 La quitridiomycosis	19
3.1.1 Características del hongo <i>B. dendrobatidis</i>	19
3.1.2 Patogénesis de la quitridiomycosis	21
3.1.3 Diagnostico de la infección causada por <i>B. dendrobatidis</i>	23
3.1.4 Factores que pueden afectar el desarrollo de la infección causada por <i>B. dendrobatidis</i>	25
3.1.5 Relación de la quitridiomycosis con la disminución global de los anfibios	26
3.2 Anuros en los Andes de Venezuela	28
3.2.1 <i>Dendropsophus meridensis</i>	29
3.2.2 Quitridiomycosis en Venezuela	30
4. MARCO METODOLOGICO	
4.1. Área de captura	32
4.2. Captura de los ejemplares de <i>D. meridensis</i> en estadios larvales	34
4.3. Mantenimiento y manipulación en cautiverio de los ejemplares en estadios larvales y adultos	35
4.4. Cultivo de la cepa de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	39
4.5. Infección experimental	40
4.6. Toma de las muestras con hisopos en los anuros	43
4.7. Extracción de ADN de <i>B. dendrobatidis</i> de los hisopos de las muestras durante el ensayo y del tejido de los animales muertos	43

4.8. Ensayos de PCR a tiempo real	45
4.9. Análisis estadísticos	47
5. RESULTADOS	
5.1 Mantenimiento de los animales	
5.1.1. Mantenimiento de las larvas de <i>D. meridensis</i>	48
5.1.2. Mantenimiento de los anuros adultos en cautiverio	48
5.2. Aislamiento de la cepa “Laguna La Esmeralda-Castebeianus-00-LV-1” de <i>B. dendrobatidis</i>	49
5.3. Ensayos de PCR a tiempo real	49
5.4. Tasas de infección	51
5.5 Tasas de supervivencia	53
5.6 Proporción de animales infectados	55
5.7 Progresión de la infección	56
5.8 Intensidad de infección y probabilidad de muerte	58
6. DISCUSIÓN	61
7. CONCLUSIONES	65
8. BIBLIOGRAFÍA	66
ÍNDICE DE FIGURAS	
Figura 1. Laguna de la Hacienda La Esmeralda, Estado Mérida. Foto: Francisco Nava.	33
Figura 2. Estanque de agua del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Estado Miranda. Foto: Leomar Villarroel.	34
Figura 3. Envases en los cuales se mantuvieron las larvas de <i>D. meridensis</i> . Foto: Leomar Villarroel.	36
Figura 4. Interior del terrario donde se mantenían los individuos adultos de ambas especies. Foto: Leomar Villarroel.	337
Figura 5. Multi-vitamínicos y Calcio específicos para reptiles y anfibios (marca Rep- Cal) utilizados para complementar la alimentación de los individuos adultos. Foto: Leomar Villarroel.	38
Figura 6. Forma de toma los individuos con guantes de látex durante su manipulación durante el ensayo. Foto: Leomar Villarroel.	38

Figura 7. Envases en los cuales se almacenaron los cultivos de <i>B. dendrobatidis</i> en medio líquido Triptona al 1% a 4°C. Foto: Leomar Villarroel.	40
Figura 8. Forma de exposición de los individuos al hongo <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> . Foto: Leomar Villarroel.	42
Figura 9. Ejemplo de la curva obtenida con los estándares de <i>B. dendrobatidis</i> y las muestras generada por el software CFX Manager versión 1.6, usado para la cuantificación de las zoosporas equivalentes en el análisis de PCR a tiempo real.	50
Figura 10. Ejemplo de las curvas de amplificación del ADN de <i>B. dendrobatidis</i> que proporciona el software CFX Manager versión 1.6, para diferentes muestras.	51
Figura 11. Porcentaje de individuos de <i>D. meridensis</i> e <i>H. crepitans</i> , con diagnósticos positivos para <i>B. dendrobatidis</i> , realizados con análisis de PCR a tiempo real, a lo largo de los 66 días del ensayo.	52
Figura 12. Diferencia de frecuencia relativa entre individuos de <i>D. meridensis</i> observados que sobrevivieron y los esperados, luego de la exposición a <i>B. dendrobatidis</i> , después de 66 días.	55
Figura 13. Progresión de la infección en los individuos de <i>Dendropsophus meridensis</i> que sobrevivieron durante el ensayo.	57
Figura 14. Progresión de la infección de los individuos de <i>Dendropsophus meridensis</i> fallecidos durante el ensayo.	58
 ANEXOS 	
Anexo I: Planilla y requerimientos para la solicitud de la Licencia de Caza con Fines Científicos y para el Contrato para el Acceso a los Recursos Genéticos para Investigadores Nacionales y Extranjeros, ante el Ministerio Popular del Ambiente, necesarios para la realización del ensayo.	85
Anexo II: Protocolo para realizar medios de cultivos de la mosca <i>Drosophila melanogaster</i> .	88
Anexo III: Cuantificación de las zoosporas de <i>B. dendrobatidis</i> en el hemocitómetro para el ensayo de infección experimental de <i>D. meridensis</i> .	89
Anexo IV: Preparación de los estándares de <i>B. dendrobatidis</i>	91
Anexo V: Resultados sin procesar de los análisis diagnósticos en el análisis PCR a tiempo real realizados a las muestras de hisopos	

de <i>D. meridensis</i> e <i>H. crepitans</i> expuestos y no expuestos a <i>B. dendrobatidis</i> , tomados durante 66 días, incluyendo la toma diagnóstico inicial.	93
Anexo VI: Datos de los animales expuestos a <i>B. dendrobatidis</i> que murieron durante el ensayo	95
Anexo VII: Resultados del procesamiento estadístico (con el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.11) de los datos obtenidos en la infección experimental de individuos de <i>D. meridensis</i> e <i>H. crepitans</i> con el hongo patógeno <i>B. dendrobatidis</i> .	96

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades emergentes figuran actualmente entre las mayores amenazas para la fauna y la flora a nivel mundial debido a su relación con la disminución de sus poblaciones, y sin embargo poco se conoce sobre su ecología e interacción con los distintos hospedadores en comparación, por ejemplo, con los patógenos humanos (Daszak y col., 2000; Jones y col., 2008). Una enfermedad emergente es aquella que ha sido descubierta recientemente, que ha incrementado su rango de incidencia, geográfico o de huéspedes recientemente; o que ha evolucionado recientemente. Entre ellas, la quitridiomycosis cutánea, una enfermedad que afecta a los anfibios, ha sido señalada como responsable de la desaparición local de varias especies de *Atelopus* en el Neotrópico (La Marca y col., 2005; Lampo y col., 2006; Rodríguez-Contreras y col., 2008) y de la extinción del sapo dorado (*Bufo peringles*) en Costa Rica (Pounds y col., 1999).

Esta enfermedad, causada por el hongo quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis*, afecta los tejidos queratinizados de los anfibios; la piel en los post-metamórficos y el disco oral en las larvas (Berger y col., 1998; Longcore y col., 1999; Pessier y col., 1999). Los animales con quitridiomycosis severa mueren producto de un mal funcionamiento de la epidermis generados por la pérdida de electrolitos y el desequilibrio osmótico a causa de la enfermedad (Voyles y col., 2007).

Si bien en poblaciones silvestres se ha detectado la presencia del patógeno sin observarse disminuciones en las poblaciones (Retallick y col., 2004; Beard y

O'Neill, 2005; Woodhams y Alford, 2005; Ouellet y col., 2005; Kriger y Hero, 2006; Puschendorf y col., 2006; Sánchez y col., 2008), se ha logrado vincular a *B. dendrobatidis* con mortalidades masivas en poblaciones silvestres de Australia (Berger y col., 1998), Centroamérica (Berger y col., 1998.; Lips, 1999; Lips y col., 2006, Cheng y col., 2011), América del Norte (Muths y col., 2003; Rachowicz y col., 2006), Europa (Bosch y col., 2001) y América del Sur (Catenazzi y col., 2010). La presencia del patógeno se extiende hasta Asia, África (Skerratt y col., 2007, Reeder y col., 2011; Savage y col., 2011; Bell y col., 2011), lo que indica una alta distribución del mismo.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el origen de esta pandemia. Una de ellas es la hipótesis del patógeno incipiente, y se basa en la reciente dispersión de *B. dendrobatidis* a través de poblaciones, que al no tener historia previa de exposiciones a este patógeno, presenta mayor susceptibilidad a desarrollar epidemias (Lips y col., 2006). Otra hipótesis es la del patógeno endémico, la cual postula que algunos fenómenos climáticos han exacerbado la patogenicidad del hongo (Pounds y col., 2006) o la susceptibilidad de las ranas al desarrollo de esta enfermedad (Alford y col., 2007), aunque la evidencia que apoya a esta hipótesis muestra inconsistencias (Kilpatrick y col., 2009).

La epidemiología de la quitridiomycosis, no obstante, es compleja ya que el resultado de la interacción entre el patógeno y el hospedador puede ser modulado por variables climáticas. Por ejemplo, la prevalencia y la intensidad de la infección en poblaciones silvestres incrementan con la altitud, con la latitud y durante los

meses más fríos y húmedos (Berger y col., 2004; Retallick y col., 2004; Woodhams y Alford, 2005; Kriger y col., 2007; Kriger y Hero, 2007; Sánchez y col., 2008). Asimismo, las disminuciones de anfibios han sido registradas más frecuentemente en tierras altas que en tierras bajas (Lips, 1999; Kriger y Hero, 2006). La progresión de la infección con *B dendrobatidis* también varía dependiendo de la especie de anfibio infectada. Este patógeno infecta a una amplia gama de hospedadores, cuyas respuestas varían drásticamente. Mientras que algunas especies desarrollan la enfermedad y mueren al poco tiempo de haber sido expuestas a *B. dendrobatidis* (Berger y col., 1998; Nichols y col., 2001; Lamirande y Nichols, 2002; Woodhams y col., 2003; Berger y col., 2004; Rachowicz y Vredenburg, 2004; Blaustein y col., 2005; Carey y col., 2006; García y col., 2006; Retallick y Miera, 2007) otras especies expuestas al hongo sobreviven sin desarrollar signos clínicos de la misma (Hopkins y Channing, 2002; Davidson y col., 2003, Daszak y col., 2004, Hanselmann y col, 2004).

Adicionalmente, mediante ensayos de laboratorio se ha logrado curar animales infectados experimentalmente, aumentando la temperatura ambiental por encima de la temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo in vitro de *B. dendrobatidis* (Davidson y col., 2003; Woodhams y col., 2003; Berger y col., 2004; Retallick y Miera, 2007). Todo ello, más los trabajos de campos realizados, sugieren que la temperatura es un factor crítico en el desarrollo de la quitridiomycosis (Kriger y Hero, 2006; Corn de 2007; Murray y col., 2009; Briggs y col., 2010. Pilliod y col., 2010.; Richards-Zawacki, 2010; Voordouw y col., 2010, Conradie y col., 2010).

Se han encontrado especies de anfibios que son capaces de eliminar la infección experimental del patógeno de manera espontánea (Lamirande y Nichols, 2002; Márquez y col., 2010; Voordouw y col., 2010; Padgett- Flohr y Hayes, 2011), incluso a la temperatura óptima de crecimiento del mismo in vitro (17°C- 23°C según Piotrowski y col., 2004). La capacidad de desarrollar infecciones sub-clínicas ha sido asociada con la presencia de péptidos antimicrobianos que protegen al animal en las fases iniciales de la infección (Rollins-Smith y col., 2002, 2003, 2006; Woodhams y col., 2007).

Existen evidencias de la presencia del patógeno en poblaciones silvestres de anfibios de la Cordillera de Mérida en los Andes Venezolanos (Sánchez y col., 2008). *Lithobates catesbeianus* (rana toro) es una especie introducida en esta zona, y en cuyas poblaciones silvestres se ha encontrado una alta prevalencia del hongo (Sánchez y col., 2008). Debido a la alta prevalencia de la infección en rana toro, esta ha sido señalada como reservorio de *B. dendrobatidis* (Hanselmann y col., 2004; Daszak y col., 2004), *L. catesbeianus* comparte hábitats con otras especies de los Andes venezolanos, como por ejemplo, la ranita merideña (*Dendropsophus meridensis*) representando una posible amenaza para esta especie.

Dendropsophus meridensis (*Hyla wilsoniana meridensis*) es una especie endémica de los Andes Venezolanos que habita en pequeños estanques de agua dulce. Debido a que su distribución geográfica es muy restringida, esta especie fue catalogada como *En Peligro* de extinción en 2004 (UICN, Unión Internacional para

la Conservación de la Naturaleza). Las poblaciones silvestres de ranitas merideñas persisten sin signos evidentes enfermedad alguna o de disminuciones poblacionales, a pesar de que cerca de una cuarta parte de sus individuos están infectados con *B. dendrobatidis* (Sánchez y col., 2008). Este hecho puede tener, al menos, dos explicaciones. Una de ellas es que *D. meridensis* actúa como reservorio de *B. dendrobatidis* al persistir con infecciones subclínicas. La otra posible explicación es que los individuos infectados mueren sin ser detectados y la tasa de reclutamiento es suficientemente alta para compensar esta mortalidad. Aún cuando la infección con *B. dendrobatidis* no parece representar un riesgo inminente para esta especie en peligro, un aumento en los niveles de estrés ambiental podrían exacerbar su vulnerabilidad (Alford y col., 2007).

Para evaluar el riesgo que representa la presencia de *B. dendrobatidis* en las poblaciones de *D. meridensis* se busca evaluar la progresión de la infección y la presencia de signos clínicos de la enfermedad en individuos expuestos al patógeno experimentalmente. Se busca determinar si los individuos de *D. meridensis* expuestos al patógeno son susceptibles a la infección, si la infección está asociada al desarrollo de signos clínicos y, por último, si los individuos poseen alguna respuesta que les permita eliminar el patógeno. Así, los cuatro escenarios posibles son: 1) *D. meridensis* no presenta signos clínicos de la enfermedad, ni PCR positivos, 2) la infección se desarrolla apreciándose PCR positivos y signos clínicos, 3) la infección se desarrolla y desaparece, sin presencia de signos clínicos y con PCR positivos al inicio y negativos al final, y por ultimo 4) los análisis de PCR son positivos, pero no se manifiestan signos clínicos

de la quitridiomycosis. La relación que existe entre la infección, el desarrollo de signos clínicos y la respuesta del hospedador ante la infección nos permitirá dilucidar si la ranita merideña es una especie vulnerable ante el patógeno y por tanto, requiere de manejo para su conservación, o si por el contrario, sólo representa un reservorio del patógeno.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la vulnerabilidad de la ranita merideña (*Dendropsophus meridensis*) al desarrollo de la quitridiomycosis cutánea mediante la exposición con el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Generar un protocolo de manutención en cautiverio de la ranita merideña a partir de estadios larvales.
- Aislar una nueva cepa del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, a partir de individuos de rana toro (*Lithobates catesbeianus*.)
- Infectar experimentalmente los individuos post metamórficos de *D. meridensis*.
- Cuantificar los cambios temporales del número de zoosporas en las ranas infectadas experimentalmente, mediante la cuantificación de ADN (PCR en tiempo real).
- Determinar la mortalidad asociada a la infección, mediante la comparación de las tasas de supervivencia de los individuos expuestos y no expuestos al patógeno.

- Estimar la carga parasitaria letal del hongo en *D. meridensis*, en caso de existir.
- Identificar signos clínicos de la enfermedad en los individuos infectados.

3. ANTECEDENTES

3.1 LA QUITRIDOMICOSIS

La quitridiomicosis cutánea es ocasionada por el hongo quítrido *Batrachochytrium dendrobatidis* y fue descubierta, durante eventos de mortandad masiva de poblaciones de anfibios en Centroamérica y Australia, entre los años 1993 y 1997 (Berger y col., 1998). Este hongo quítrido (Chytridiomycota; Chytridiales) tiene la particularidad que es la única especie del Phylum Chytridiomycota que parasita a vertebrados (Berger y col., 1998).

3.1.1 CARACTERISTICAS DEL HONGO *B. DENDROBATIDIS*

Batrachochytrium dendrobatidis es un hongo diploide, cuyas esporas flageladas son móviles y acuáticas. (Berger y col., 1998; Pessier y col., 1999; Longcore y col., 1999). Este hongo tiene dos fases de vida características de todos los quitridios: una fase sésil, en donde la reproducción se realiza mediante zoosporangios; y una fase móvil, representada por zoosporas uniflageladas que son liberadas de la zoosporangios. Dicha fase móvil es la que permite la dispersión e infección (Longcore y col., 1999; Piotrowski y col., 2004; Berger y col., 2005a). La zoospora móvil mide entre 3-5 μm de diámetro y tiene un flagelo posterior de 19-20 μm de largo. El zoosporangio tiene forma esférica o sub-esférica, un tamaño aproximado de 40 μm de diámetro, y presenta una papila o tubo de descarga a través de la cual se liberan las zoosporas (Berger y col., 1998; Pessier y col., 1999; Longcore y col., 1999).

In vitro y en ranas infectadas sometidas a diferentes a temperaturas, se ha determinado que *B. dendrobatidis* puede crecer y reproducirse entre 4 y 25°C, aún puede sobrevivir a temperaturas por debajo de 0°C (Gleason y col., 2008). Su óptimo de crecimiento se encuentra entre 17 y 24°C, y muere si es sometido a temperaturas superiores a los 30°C (Piotrowski y col., 2004).

Se ha propuesto que el hongo hace uso de la queratina como nutriente. Esta afinidad por la queratina se evidencia por la ausencia de infección en los tejidos no queratinizados de las larvas y de los individuos post metamórficos (Berger y col., 1998). No obstante, no existen evidencias de la degradación de este componente producto de *B. dendrobatidis* (Piotrowski y col., 2004). Se desconoce si el esporangio utiliza nutrientes de la piel y cuáles, o si es la estructura de la epidermis estratificada de los anfibios que favorece la supervivencia del hongo (Berger y col., 2005a). El desarrollo de los esporangios inmaduros ocurre en las células más profundas de la epidermis, mientras que los maduros se localizan en las capas superiores, donde hay mayor concentración de queratina (Berger y col., 2005a).

A pesar de su afinidad por la queratina, se ha encontrado que *B. dendrobatidis* puede sobrevivir hasta tres meses en agua estéril (Johnson y Speare, 2005). A pesar de ello no se ha encontrado el hongo en muestras tomadas del ambiente después de los eventos de extinción conocidos (Kilpatrick y col., 2009). La capacidad de sobrevivir fuera de un hospedador resulta de vital importancia para la dinámica de transmisión (Kilpatrick., 2009) y puede generar la

extinción del hospedador debido a su persistencia en el medio (Mitchell y col., 2008).

3.1.2 PATOGENESIS DE LA QUITRIDOMICOSIS

A pesar de que desde hace una década se realizan investigaciones sobre la quitridiomicosis, aún no se tiene claridad sobre la patogénesis (causas de la enfermedad y muerte de hospedero) de *B. dendrobatidis*. Sin embargo la presencia de algunos signos clínicos es lo que permite diagnosticar a la enfermedad (Berger y col., 1998; Pessier y col., 1999; Nichols y col., 2001; Daszak y col., 2004).

B. dendrobatidis parasita las células epidérmicas queratinizadas de las ranas post-metamórficas causando la hiperqueratosis (aumento marcado del estrato corneo, entre 5 y 10 capas gruesas de células queratinosas) y la hiperplasia (aumento anormal en el número de células de la epidermis) de la capa córnea y del estrato granuloso, especialmente en el área ventral, la pelvis, la zona inguinal y las membranas interdigitales. (Berger y col., 1998). La zona ventral de los animales post metamórficos suele ser las más afectada por estar en mayor contacto con el agua donde se encuentran las zoosporas (Pessier y col., 1999). La zona dorsal, por el contrario, se infecta rara vez quizás debido a la mayor abundancia de glándulas que pudiera secretar sustancias que inhiban la infección (Berger y col., 2005c). Debido a que la piel de los anfibios es un órgano en el cual ocurre la absorción de agua, la respiración y la osmoregulación (Duellman y Trueb, 1986), se ha sugerido que el engrosamiento de las capas impermeables de

la piel podría interferir con estos procesos vitales (Berger y col., 1998; Pessier y col., 1999). Recientemente, se demostró que en ranas infectadas, la capacidad de transporte de iones a través de las células disminuye (Voyles y col., 2009). Además se ha detectado que el tamaño de los esporangios pueden influir en el grado de la patología (Fisher y col., 2009).

En los renacuajos, el parásito se aloja en el disco oral, sin encontrarse rastros en el resto del tejido corporal (Berger y col., 1998; Daszak y col., 1999). Aún cuando las larvas frecuentemente desarrollan infecciones sub-letales, las lesiones en el área bucal pudieran reducir su eficiencia para el pastoreo, su ingesta de alimentos e, indirectamente, la supervivencia (Parris y Baud, 2004; Parris y Cornelius, 2004). También se observó que las ranas expuestas a *B. dendrobatidis* a lo largo del desarrollo larval, tienen mayor probabilidad de morir después de la metamorfosis, aún sin evidencias de infección (Garner y col., 2009).

Las ranas enfermas suelen presentar una postura corporal anormal, decoloración de la piel, inapetencia, letargia y pérdida de reflejos. Otros síntomas menos comunes son ulceraciones y muda anormal de la epidermis, hemorragias en la piel o congestiones de las vísceras, días previos a la muerte del animal (Berger y col., 1998). Sin embargo, se han reportado casos en los cuales las ranas infectadas mueren sin presentar signos clínicos, salvo anorexia y letargia el día antes de su muerte (Pessier y col., 1999). Las larvas infectadas con el patógeno, por el contrario, no desarrollan signos clínicos evidentes. Sin embargo, en algunas ocasiones pueden presentar malformaciones en la boca (Fellers y col., 2001;

Parris y Beudoin 2004), e incluso una pérdida de parte o todo el disco oral queratinizado (Blaustein y col., 2005).

Los animales susceptibles a la enfermedad tienden a morir de tres a siete semanas después de la exposición al patógeno (Berger y col., 2004), aunque el tiempo de incubación de la enfermedad depende de la dosis de infección, la cepa del hongo, la temperatura, el tiempo de exposición y la especie del anfibio (Berger y col., 1998; Lamirande y Nichols 2002; Nichols y col., 2001; Woodhams y col., 2003; Berger y col., 2004; Carey y col., 2006).

3.1.3 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCION CAUSADA POR *B. DENDROBATIDIS*

El diagnóstico de la infección puede realizarse mediante dos procedimientos: métodos histológicos o análisis de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) (Hyatt y col., 2007). Los ensayos histológicos, basados en la tinción con hematoxilina y eosina de una parte del tejido extraída del animal, pueden realizarse en diversos laboratorios y son los únicos que permiten diagnosticar la presencia del hongo en tejido preservado en formol. Sin embargo, este método subestima la presencia del hongo en el individuo y no permite detectar la presencia de *B. dendrobatidis* en etapas tempranas de la infección debido a su baja sensibilidad en la detección (Kilpatrick y col., 2009). Otra desventaja de esta metodología es que es muy invasiva y, por tanto, puede resultar perjudicial para animales vivos (Hyatt y col, 2007). El análisis de PCR resulta un método más eficaz para detectar la presencia de *B. dendrobatidis*,

incluso en fases iniciales de la infección (Hyatt y col., 2007). El ensayo de PCR consiste en amplificar un fragmento del ADN del hongo. La técnica se basa en la propiedad de la ADN Taq polimerasa (enzima catalizadora de la síntesis de ADN), para replicar hebras de ADN. Durante este procedimiento se alternan ciclos de bajas y altas temperaturas que permiten separar cadenas dobles de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación para que vuelvan a unirse a polimerasas y volver a ser replicadas. El fragmento o región amplificado mediante estas técnicas tiene una composición muy específica, lo que permite que el ensayo sea muy sensible para identificar el patógeno (Boyle y col., 2004).

Se han desarrollado dos tipos de ensayos de PCR para la detección de *B. dendrobatidis*: la PCR convencional y la PCR a tiempo real. En la PCR convencional, el ADN amplificado se identifica mediante separación por peso molecular en una electroforesis en gel de agarosa, y es posible detectar el ADN equivalente a 10 zoosporas (Annis y col., 2004). No obstante, en muestras con menos de 10 zoosporas pueden generar un falso negativo. En la PCR a tiempo real, por el contrario, se genera una señal fluorescente durante la replicación del ADN, que permite detectar y cuantificar los productos amplificados de la región específica de ADN durante cada ciclo. La sensibilidad de los termocicladores ópticos que se usan en estos ensayos permiten detectar el ADN equivalente 0,1 zoosporas en una muestra (Hyatt y col., 2007). Este método es menos invasivo, ya que basta con realizar frotis con hisopos sobre la piel de los anfibios para detectar el patógeno y estimados del número del número de zoosporas en el tejido. Esta

técnica también permite detectar la presencia de *B. dendrobatidis* en muestras ambientales (Kirshtein y col., 2007).

Aún cuando los ensayos de PCR permiten tener una idea del nivel de infección determinando la presencia del hongo, no es posible determinar el desarrollo de la enfermedad (Kriger y Hero, 2006; Hyatt y col., 2007).

3.1.4 FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR EL DESARROLLO DE LA INFECCION CAUSADA POR *B. DENDROBATIDIS*

Actualmente no se tiene claro si el patógeno es introducido y afecta poblaciones que previamente no estaban expuestas, siendo más susceptibles a desarrollar la enfermedad (Lips y col., 2006), o si por el contrario es un patógeno endémico que afecta a las poblaciones adyacentes producto de los cambios en la susceptibilidad de las especies, de los cambios climáticos o de variaciones en la virulencia del hongo (Morehouse y col., 2003; Weldon y col., 2004; Rachowicz y col., 2005; Pounds y col., 2006; Alford y col., 2007; Lips y col., 2008; James y col., 2009).

Por otra parte, la inmunidad de los anfibios ante la exposición a *B. dendrobatidis* puede verse afectada por factores como la edad o la presencia de otras enfermedades (Pessier y col., 1999). Igualmente la dosis de infección, el tiempo de exposición al hongo, la cepa del hongo (tiempo y replicas en el caso de infecciones experimentales), la temperatura y el hospedero en sí, pueden influir en la mortalidad y el tiempo que tarda en producirse a causa de la enfermedad

(Berger y col., 1998; Ardipradja, 2001; Nichols y col., 2001; Lamirande y Nichols, 2002; Woodhams y col., 2003; Berger y col., 2004; Carey y col., 2006; Bustamante y col., 2010). La exposición a pesticidas y situaciones que generen estrés en los anfibios silvestres pueden influir en el desarrollo de la infección (Carey y col., 1999; Davidson y col., 2001; Hopkins y Channing, 2002; Davidson y col., 2003).

Entre los individuos y poblaciones de una misma especie, se ha encontrado variabilidad en la susceptibilidad al hongo (Hopkins y Channing, 2002; Rollins-Smith y col., 2002; Davidson y col., 2003; Parris y Beaudoin, 2004). En poblaciones de una misma localidad se han encontrado casos fatales, pero también ausencia de la enfermedad (Kriger y Hero, 2006). Por otra parte hay poblaciones y especies que se muestran resistentes al desarrollo de la enfermedad, aun cuando son susceptibles a la infección, convirtiéndose en reservorios del patógeno, transportando así la infección a otras poblaciones (Hopkins y Channing 2002; Davidson, y col., 2003; Daszak y col., 2004; Hanselmann y col., 2004).

3.1.5 RELACION DE LA QUITRIDOMICOSIS CON LA DISMINUCION GLOBAL DE LOS ANFIBIOS

La disminución global de las poblaciones de anfibios representa uno de los mayores problemas de pérdida de biodiversidad durante las últimas dos décadas. Del total de las 34 especies catalogadas como extintas para el año 2006, nueve de ellas desaparecieron a partir del año 1980 (UICN, Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) y otras 113 especies se consideraban

posiblemente extintas ya que no existen reportes desde hace tres décadas. En las dos últimas décadas, han desaparecido 30 de las 113 especies de sapitos arlequines del género *Atelopus*, probablemente debido a la incidencia de la quitridiomycosis (Mendelson y col., 2006).

Según la Evaluación Global de Anfibios (UICN), la clase de vertebrados más amenazada actualmente son los anfibios; cerca de 32,5%, de un total de aproximadamente 6000 se encuentran en alguna categoría de amenaza — *Vulnerable, En Peligro, En Peligro Crítico*. Se estima que 92% de los anfibios que se encuentra en peligro crítico han disminuido debido al hongo *B. dendrobatidis*. La mayoría de las disminuciones de poblaciones de anfibios han ocurrido en especies asociadas a cuerpos de agua (Stuart y col., 2004; Lips y col., 2005b) y que habitan regiones montañosas superiores a los 500 m de altura (Young y col., 2001; Stuart y col., 2004).

El ciclo de vida bifásico de los anfibios y la importancia de la piel en acciones fundamentales como el intercambio gaseoso y la absorción de agua pudieran ser razones que justifiquen porque este grupo está más amenazado que otros (Daszak y col., 1999).

Al responsabilizar al hongo como posible causante de la debacle de anfibios a nivel mundial, algunos estudios se ocuparon de determinar, mediante muestras antiguas de museos, la aparición del hongo en los distintos continentes y determinar un posible origen para el mismo. En 2004, Weldon y col., realizan el primer registro cronológico de *B. dendrobatidis*, en un ejemplar de *Xenopus laevis*,

colectado en el año 1938 en África, y sugieren a este continente como el origen de la enfermedad. Estudios genéticos de las secuencias entre muestras de *B. dendrobatidis* con diversos orígenes, revelan poca variación entre las mismas, hecho que refuerza la idea de que este hongo se ha transportado recientemente a estas regiones (Morehouse y col., 2003).

3.2 ANUROS EN LOS ANDES DE VENEZUELA

En Venezuela, se han descrito cerca de 333 especies de anfibios, de las cuales 191 son endémicas, lo cual ubica al país en el octavo lugar en el mundo en cuanto a diversidad anfibia se refiere (Barrios- Amorós, 2009). Sin embargo según la Evaluación Mundial de los Anfibios (Global Amphibian Assessment IUCN, 2007) un poco más de un cuarto de las especies de anfibios en Venezuela se encuentran amenazadas; 18 de ellas están en Peligro Crítico de extinción (nueve de ellas del género *Atelopus*) y una Probablemente Extinta (Rodríguez y Rojas Suarez, 2008).

Cerca de 35% de las especies de anfibios del país se encuentran en los Andes (La Marca, 1998). Dicha diversidad y endemismo se debe a una alta riqueza de ambientes ecológicos, topografías accidentadas y diferentes pisos térmicos. Una de las amenazas para los anfibios en los Andes venezolanos es la presencia de *Lithobates catesbeianus* (rana toro) (Barrios- Amorós, 2001), una especie introducida en la Cordillera de Mérida a finales de la década de los 90 (Hanselmann y col., 2004). Esta especie ha sido catalogada entre las 100 peores especies invasoras debido a su capacidad de desplazar a otros anfibios

(Kupferberg, 1997; Kiesecker y Blaustein, 1998; Kiesecker y col., 2001), además de ser un reservorio de *B. dendrobatidis* (Hanselmann y col., 2004; Daszak 2004).

3.2.1 DENDROPSOPHUS MERIDENSIS

La ranita merideña *Dendropsophus meridensis*, (igual *Hyla wilsoniana meridensis*, de la familia Hylidae) (Rivero, 1961) es una especie endémica de la Cordillera de Mérida actualmente En Peligro debido a que se estima que su distribución se restringe a menos de 5000 km² y su hábitat se encuentra en constante degradación debido a la presión antrópica (La Marca, 2004).

D. meridensis habita en pequeños estanques de agua dulce en bosques nublados de los Andes venezolanos, en regiones aledañas al Parque Nacional Sierra de la Culata y/o el Parque Nacional de Sierra Nevada. Esta especie deposita sus huevos directamente en el agua, en donde se desarrollan las larvas. Las actividades agrícolas y de ganadería, así como la contaminación que de ella se derivan son una de sus principales amenazas para *D. meridensis* (La Marca, 2004). La ranita merideña comparte hábitats con *L. castebeianus*, la cual está catalogada como una especie reservorio de *B. dendrobatidis* (Hanselmann y col., 2004; Daszak 04), y representa una amenaza para las poblaciones cercanas (Barrios- Amorós, 2001). Se estima que cerca de un tercio de individuos de *D. meridensis* en condiciones naturales se encuentran infectadas por el hongo *B. dendrobatidis* (Sánchez y col., 2008), y a pesar de ello, no hay evidencias de individuos enfermos.

3.2.2 QUITRIDOMICOSIS EN VENEZUELA

El primer registro *B. dendrobatidis* en Venezuela proviene de un sapito rayado, *Atelopus cruciger*, recolectado en la Cordillera de la Costa en 1986 (Bonaccorso y col., 2003). Posteriormente, este hongo fue detectado en tres otras especies de *Atelopus* (*A. carbonerensis*, *A. sorianoi* y *A. mucubajensis*) recolectadas en la Cordillera de Mérida en 1988 (Lampo y col., 2006).

Por su parte, Sánchez y col. (2008) encontraron en los Andes venezolanos a *B. dendrobatidis* en el 65% de las 17 especies examinadas, 6 de ellas endémicas, incluyendo *D. meridensis*. En este trabajo se reporta una alta prevalencia del hongo y baja mortalidad en las poblaciones silvestres de *D. meridensis* y *L. catesbeianus*. El hecho de que la rana toro sea un reservorio del hongo representa un problema para las poblaciones de anfibios de los Andes venezolanos (Hanselmann y col., 2004), ya que además la persistencia a largo plazo del hongo puede propiciar, bajo ciertas condiciones, brotes epidémicos en otras poblaciones de anfibios (Lampo y col., 2007).

Pese a que no se han registrado recientemente disminuciones drásticas de poblaciones de anfibios en Venezuela, Lampo y col. (2008) aseveran que la quitridiomicosis cutánea es uno de los factores de riesgo más importantes para este grupo de vertebrados, debido a la amplia distribución del patógeno en las zonas montañosas, donde se encuentra la mayor diversidad de especies endémicas. *Batrachochytrium dendrobatidis* persiste actualmente en poblaciones

silvestres de anfibios en la cordillera de La Costa y la Cordillera de Mérida (Lampo y col., 2008).

4. MARCO METODOLOGICO.

Para la realización de este proyecto fue necesario solicitar ante el Ministerio del Poder Popular para el Ambiente (MINAMB) los permisos necesarios: la Licencia de Caza con fines Científicos y el Contrato de Acceso a los Recursos Genéticos para Investigadores Nacionales y Extranjeros que permite trabajar con el ADN de *B. dendrobatidis* (ver anexo I).

4.1 AREA DE CAPTURA

La recolección de individuos de *D. meridensis* se llevó a cabo en una laguna artificial de la hacienda vaquera La Esmeralda cercana al sector San Eusebio, vía La Azulita, en el Municipio Andrés Bello del estado Mérida (8°38' N - 71°23' O: 2240 m). La vegetación que predomina alrededor de la laguna es herbácea (ver figura 1). En esta región se han observado individuos de *D. meridensis* a lo largo de varios años (Lampo y col., sin publicar), lo cual sugiere que estas poblaciones son relativamente estables.



Figura 1. Laguna de la Hacienda La Esmeralda, Estado Mérida. Foto: Francisco Nava.

Los adultos de *Hypsiboas crepitans* fueron capturados en cuerpos de agua artificiales dentro del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), sector Alto de Pipe del estado Miranda (10°23'N - 66 °57'W, 1360 m) (ver figura 2); y sirvieron de control de la actividad del hongo basados en el trabajo de Márquez y col., 2010.



Figura 2. Estanque de agua del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Estado Miranda. Foto: Leomar Villarroel.

4.2 CAPTURA DE LOS EJEMPLARES DE *D. MERIDENSIS* EN ESTADIOS LARVALES

El muestreo se realizó durante el 19 y 20 de noviembre de 2010, en una de las lagunas donde se observaron indicios de reproducción como lo es la presencia de larvas. Los 51 renacuajos se recolectaron manualmente, la mayor parte en las últimas fases del desarrollo larval, hecho que minimiza el impacto sobre las densidades poblacionales (Lampo y de Leo, 1998). La identificación de las larvas se llevó a cabo con la ayuda de una clave que permite identificar hasta el nivel de familia Hylidae (Mijares-Urrutia, 1998) y basados en descripciones morfológicas del grupo del laboratorio. Adicionalmente, se tomaron muestras de

tres renacuajos de *Lithobates castebeianus*, de las cuales se aisló posteriormente el hongo para las infecciones experimentales. Durante el mes de mayo de 2011, se capturaron cinco adultos de *H. crepitans* en estanques de agua ubicados en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Para evitar la transmisión de patógenos entre localidades, se siguieron protocolos de bioseguridad (Aguirre y Lampo, 2006).

4.3 MANTENIMIENTO Y MANIPULACIÓN EN CAUTIVERIO DE LOS EJEMPLARES EN ESTADIOS LARVALES Y ADULTOS

Se introdujeron las larvas de *D. meridensis* en bolsas plásticas individuales para su traslado hasta el laboratorio. Una vez en el laboratorio, las larvas se mantuvieron individualmente en envases plásticos de 13,5 cm de profundidad y 11 cm de diámetro, a 23°C con un fotoperiodo de 12 horas luz/ oscuridad (ver figura 3).



Figura 3. Envases en los cuales se mantuvieron las larvas de *D. meridensis*. Foto: Leomar Villarroel.

Las larvas fueron alimentadas con comida para peces en hojuelas (Nutrafin Mix ®). Se hizo un recambio del agua cada dos días, dependiendo de la cantidad de residuos de alimento y excretos del animal. Cuando los ejemplares alcanzaron estadios post metamórficos se trasladaron a terrarios individuales (19 cm x 30 cm x 9 cm de altura) en los cuales se colocaron recipientes con algodones mojados para mantener la humedad, y papel absorbente como sustrato (ver figura 4). A partir de observaciones diarias se decidió cuando realizar el mantenimiento general de los terrarios, el cual incluía humedecer y cambiar el papel absorbente, el algodón; agregar agua a los envases, así como limpiar el terrario.



Figura 4. Interior del terrario donde se mantenían los individuos adultos de ambas especies. Foto: Leomar Villarroel.

Los individuos adultos de *D. meridensis* se alimentaron con mosquitas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y grillos cultivados en el laboratorio, según el protocolo sugerido por los Laboratorios Docentes de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (ver anexo II). Para complementar la alimentación, se esparcieron multi- vitaminas y calcio Rep-Cal® para reptiles y anfibios (ver figura 5) sobre las moscas o los grillos, justo antes de suministrarlos a las ranas. Para determinar la frecuencia y cantidad de alimento suministrado a los ejemplares post metamórficos, se observó días después, la presencia o no de insectos. De igual forma se determinó la alimentación y el mantenimiento de los individuos de *H. crepitans*.



Figura 5. Multi-vitamínicos y Calcio Rep-Cal para reptiles y anfibios utilizados para complementar la alimentación de los individuos adultos. Foto: Leomar Villarroel.

Se manipularon las ranas individualmente con guantes de látex estériles para disminuir la posibilidad de contaminación de individuos sanos por *B. dendrobatidis* procedente de otros infectados (ver figura 6).



Figura 6. Forma de toma los individuos con guantes de látex durante su manipulación durante el ensayo. Foto: Leomar Villarroel.

4.4 CULTIVO DE LA CEPA DE *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

El aislamiento de zoosporas de *B dendrobatidis* se realizó a partir del disco oral de las larvas de rana toro, debido a la alta prevalencia de infección que mantiene esta especie (Hanselmann y col., 2004; Sánchez y col., 2008). Para aislar el hongo, se cortaron pequeños trozos del disco oral (1-2 mm²), los cuales fueron lavados y limpiados mediante el arrastre del tejido con una aguja estéril a través del medio sólido con antibiótico (triptona 1%, agar 1%, penicilina 0.02%) (Pessier y col., 1999). Este procedimiento remueve microorganismos superficiales (bacterias y levaduras) que no son controlados por los antibióticos en el medio nutritivo (Pessier y col., 1999). Luego de la limpieza, se transfirieron los trozos de piel a capsulas de Petri con medio sólido fresco (Tryptona 1%, agar 1%), y se incubaron a 18°C. Se observó diariamente el crecimiento de colonias de *B. dendrobatidis* y se corroboró la ausencia de contaminación de las placas por bacterias o levaduras. Luego de tres a cuatro semanas de incubación, se aislaron los zoosporangios de la superficie del tejido infectado con una aguja estéril. Se sembraron los zoosporangios extraídos en medio líquido triptona al 1% y se almacenaron a 4°C (ver figura 7) hasta el inicio de los ensayos. La cepa aislada fue denominada “Laguna La Esmeralda-Castebeianus-00-LV-1”, según la nomenclatura propuesta por Berger y col. (2005b).



Figura 7. Envases en los cuales se almacenaron los cultivos de *B. dendrobatidis* en medio líquido Triptona al 1% a 4°C. Foto: Leomar Villarroel.

4.5 INFECCIÓN EXPERIMENTAL

Para realizar la infección experimental se inocularon 27 placas de Petri (medio sólido; Triptona 1% - penicilina al 0.02%), cada una con 200 μ l del medio líquido con la cepa “Laguna La Esmeralda-Castebeianus-00-LV-1”, y se, incubaron a 18°C por dos semanas. Posteriormente se cosecharon las zoosporas en 1 ml de agua mineral. El producto de la cosecha de todas las placas se combinó para obtener un volumen total de 50 ml. Mediante un hemocitómetro se cuantificaron las zoosporas móviles, y se obtuvo un promedio 13×10^6 zoosporas/ml. Debido a que la concentración de zoosporas requerida para la infección era de 3×10^6 zoosporas/ml (Márquez y col., 2010), se diluyó el producto de la cosecha en 90 ml para obtener la concentración deseada. Posteriormente corroboramos la

concentración de zoosporas mediante un nuevo conteo (ver anexo III: Cuantificación de zoosporas en el hemocitómetro). Para la inoculación de los sujetos control, se sembraron 17 placas con medio sólido de Triptona 1%-penicilina al 0.02% pero sin el inóculo. Se obtuvieron 15 ml de líquido luego de simular la cosecha de zoosporas, los cuales se complementaron con agua mineral para un total de 55 ml.

Para descartar la posibilidad de que algunos individuos del grupo control pudieran estar infectados naturalmente se diagnosticaron todos los individuos, mediante ensayos de PCR a tiempo real. Se asignaron los individuos al grupo control o al grupo infectado aleatoriamente. No obstante, debido a que se detectaron cinco individuos positivos con cargas bajas de zoosporas, estos fueron asignados al grupo infectados. Se infectaron 22 animales, 17 sin evidencias de infección y cinco infectados naturalmente. Los restantes 15 animales sin indicios de infección se usaron como control (no infectados).

De igual forma se expusieron cinco individuos de *H. crepitans* como controles positivos, basados en los resultados de Márquez y col. (2010). Debido a que *B. dendrobatidis* es capaz de infectar a *H. crepitans* expuestas experimentalmente, estos controles permiten corroborar si la cepa está activa. No se usaron controles para determinar la letalidad de la cepa debido a que las únicas especies conocidas en Venezuela vulnerables a la enfermedad son especies en peligro crítico de extinción.

La exposición a *Batrachochytrium dendrobatidis* se realizó en bolsas plásticas con 3 ml del inoculo (9×10^6 zoosporas/ml) (ver figura 8). Durante 24 horas, los anuros permanecieron en las bolsas a 23°C con fotoperiodo luz/oscuridad de 12 horas. Para los animales control el tratamiento fue similar pero usando con un inoculo sin zoosporas. Cada dos horas aproximadamente se revisaba si el animal estaba en contacto con el líquido y las condiciones del mismo. En caso de que el animal no estuviese en contacto con el inoculo, se manipulaba la bolsa de manera tal que el animal se sumergiera en el líquido. De esta manera se garantizaba que, al menos cada dos horas, durante 24 horas, los individuos estuvieran en contacto con el inoculo. Luego que el periodo de exposición de 24 horas terminó, los animales fueron sacados de las bolsas y se depositaron en sus respectivos terrarios a 23°C con el mismo fotoperíodo antes mencionado.



Figura 8. Forma de exposición de los individuos al hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*. Foto: Leomar Villarroel.

4.6 TOMA DE LAS MUESTRAS CON HISOPOS EN LOS ANUROS

Una vez infectados, se tomaron muestras de piel con hisopos estériles cada seis días durante 66 días, para un total de once muestras. Para la toma de cada muestra, el animal fue lavado con agua mineral con el fin de remover cualquier residuo en la piel que pudiera inhibir o alterar la amplificación de ADN, y también para eliminar restos de zoosporas muertas que pudieran arrojar un falso positivo. El hisopo estéril se pasó unas 10 veces sobre la piel en las membranas interdigitales y la ingle, zonas más comúnmente afectadas por el patógeno. Una vez tomadas las muestras, los hisopos se guardaron en sus respectivos contenedores y se almacenaron a -4°C hasta su procesamiento (Márquez y col., 2010). A los animales que murieron durante el ensayo se les realizó una disección aséptica del cuarto dedo del pie derecho. De estos dedos se obtuvieron 1-3 mg de muestra de tejido y se almacenaron en etanol al 70% para posteriores análisis de PCR a tiempo real y el cuerpo se conservó en alcohol absoluto.

4.7 EXTRACCIÓN DE ADN DE *B. DENDROBATIDIS* DE LOS HISOPOS DE LAS MUESTRAS DURANTE EL ENSAYO Y DEL TEJIDO DE LOS ANIMALES MUERTOS

La extracción de ADN del hongo a partir de las muestras en los hisopos se llevó a cabo con Prep-Man Ultra (Applied Biosystems) (Boyle y col., 2004). Dicho protocolo consistió en:

- Colocar en un vial estéril de 1,5 ml el extremo del hisopo con el algodón o 1-3 mg del tejido del animal (por lo general un trozo del dedo). Añadirle 40-50 μ l de Prep-Man Ultra (Applied Biosystems) y 30-40 mg de esferas de zirconio/sílice de 0,5 mm de diámetro. Todo esto se realizó cerca de la flama para mantener la esterilidad.
- Homogeneizar el contenido de los viales por 50 seg en un Mini Beadbeater.
- Centrifugar los viales durante 30 seg a 13000 rpm.
- Repetir los pasos 2 y 3.
- Sumergir los viales en agua a 100°C durante 10 min y luego dejar enfriar durante 2 min.
- Centrifugar los viales durante 3 min a 13000 rpm.
- Finalmente extraer aproximadamente 20 μ l del sobrenadante de cada vial y almacenar a -20°C en nuevos viales.

En cada extracción se hizo un blanco de extracción o control negativo siguiendo el mismo protocolo, pero sin incluir muestras de anuros, para descartar la contaminación por el hongo entre las muestras durante el procedimiento. En casos muy particulares y escasos, durante la extracción del ADN, no fue posible lograr extraer el mismo (no había sobrenadante en el vial). Estos casos corresponden al animal 45 en el día 30 del ensayo, y los animales 4 y 50 en el día 36. Dichos resultados se omitieron del análisis.

4.8 ENSAYOS DE PCR A TIEMPO REAL

Para detectar la presencia de *B. dendrobatidis* y estimar el número de zoosporas en los tejidos se hicieron ensayos de PCR a tiempo real (Boyle y col., 2004). El protocolo se describe a continuación:

En los tubos plásticos especialmente diseñados para el análisis de PCR a tiempo real se colocaron 25 µl de reacción, los cuales contenían:

- Taq- Man R Master Mix (Applied Biosystems)
- Ambos primers: AL5272 y AL5273 (Applied Biosystems) a una concentración de 0,9 µl. La secuencia de los primers (ADN ribosomal) es:
 - Region ITS1: 5`-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC – 3`
 - Region 5.8S: 5`- AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA – 3`
- Taq- Man MGB (Applied Biosystems), a una concentración de 0,25 µl.
- Agua destilada
- 5 µl de ADN del hongo de las muestras, diluido 1/10 en agua destilada.

Se colocaron los tubos en la placa del termociclador Mini Opticon System de Bio Rad, y se configuro el software CFX Manager versión 1.6, de acuerdo a la ubicación de las muestras, los controles y los estándares en la placa. El protocolo del termociclador para la amplificación del ADN fue:

- 2 min a 5°C,
- 10 min a 95°C,
- 15 seg a 95°C,
- 1 min a 60°C,
- 50 ciclos con los últimos dos pasos.

En cada placa se montaron muestras de tejidos por duplicado, controles negativos y estándares para la cuantificación, también por duplicado. El estándar de amplificación del ADN de *Batrachochytrium dendrobatidis* fue proporcionado por el Australian Animal Health Laboratory (AAHL) (ver anexo IV: preparación de los estándares de *B. dendrobatidis*). Este estándar se diluyó de manera seriada 1/10, obteniendo 100, 10, 1 y 0,1 zoosporas equivalentes para cada 25 µl de reacción, permitiendo al software del PCR de tiempo real construir una curva de calibración para la cuantificación de las zoosporas en las muestras. El coeficiente de determinación (R^2) de la curva de calibración permite estimar la precisión de las diluciones seriadas y la reproducibilidad entre las replicas. En cada ensayo de PCR a tiempo real, se incluyeron controles negativos para descartar la contaminación por el hongo entre las muestras durante el proceso de extracción y la propia PCR.

El criterio para considerar una muestra positiva fue si en las dos replicas el número de zoosporas equivalente cuantificadas era mayor o igual a 0.1. El

software CFX Manager, versión 1.6, promediaba automáticamente ambos valores para determinar el número de zoosporas equivalentes presentes en la muestra. Ya que dicha muestra estaba diluida, se multiplicó por el factor de dilución entre la extracción y el producto final (80) para determinar el número de zoosporas equivalentes totales presentes en la muestra. En aquellos casos en los que los valores de las réplicas de una misma muestra fueron muy diferentes, se repitió el ensayo con el ADN almacenado.

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar las pruebas estadísticas se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.11. Para calcular la proporción de individuos fallecidos al final del ensayo entre los tratamientos infectados y re infectados se utilizo una prueba exacta de Fisher. Una vez se comprobó que ambos grupos son iguales, se comparo entre los expuestos al patógeno (infectados mas re infectados) y los controles, utilizándose el estadístico Chi cuadrado (X^2) en tablas de contingencia (Sánchez y col., 2008).

Mediante el estadístico t de student se comparó la carga parasitaria de los animales muertos por la exposición usando tanto las muestras de hisopo como las muestras de tejido de los animales muertos y la máxima carga que presentaron los sobrevivientes a la misma. A todos los valores que representan el número de zoosporas se les aplico una transformación logarítmica (\log_{10}) para lograr la homogeneidad de varianzas (Sánchez y col., 2008).

5. RESULTADOS

5.1 MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES

5.1.1 MANTENIMIENTO DE LAS LARVAS DE *D. MERIDENSIS*

Del total de 51 larvas de *D. meridensis* capturadas, 14 murieron en estadios larvales o como juveniles antes de comenzar los ensayos. No se les tomaron muestras con hisopos ni de tejido, por lo que el motivo de la muerte no pudo ser determinado. Los 37 animales restantes llegaron a estadios post metamórficos durante los tres meses subsiguientes a su captura. Cada larva fue identificada con un número con el cual se le hizo seguimiento a lo largo del ensayo. La alimentación de las larvas y el cambio del agua en los envases, se realizaba cada dos días para evitar la contaminación del agua producto de los residuos de alimento y las propias excreciones de los animales.

5.1.2 MANTENIMIENTO DE LOS ANUROS ADULTOS EN CAUTIVERIO.

En las condiciones en las cuales se mantenían los animales (terrarios con papel como sustrato a 23°C, y fotoperiodo luz/oscuridad de 12 horas) se hizo necesario cambiar el agua y humedecer el papel y el algodón cada dos días. Semanalmente se hacía el mantenimiento general del terrario: se cambiaba el papel, el algodón, se limpiaba el envase y los recipientes de agua. Se estableció la frecuencia óptima de alimentación de los individuos adultos: cada dos o tres días se agregaban entre 20 y 30 moscas, o 10 grillos. Sin embargo, debido a que la tasa de producción de grillos fue baja, la alimentación que predominó fue a base

de moscas. En los individuos de *H. crepitans* tampoco se apreciaron comportamientos anormales luego de la infección. Al ser animales de mayor tamaño, el número de moscas suministradas fue mayor (30-40) y fue necesario limpiar los terrarios con una mayor frecuencia (4-5 días).

5.2 AISLAMIENTO DE LA CEPA “LAGUNA LA ESMERALDA-CASTEBEIANUS-00-LV-1” DE *B. DENDROBATIDIS*

Tanto las colonias aisladas como las características morfológicas del hongo coincidieron con las descripciones hechas en trabajos previos. Las colonias tenían un color blanco- amarillo, y poseían forma irregular con variaciones de tamaños, similares a las descritas por Pessier y col. (1999). Las características morfológicas del hongo observadas fueron: zoosporas móviles de forma elongada a ovoide y zoosporangios de forma esférica o sub esférica con sus papilas de descarga, lo cual coincide con las descripciones realizadas por Berger y col. (1998); Pessier y col. (1999); Longcore y col. (1999).

5.3 ENSAYOS DE PCR A TIEMPO REAL

En ninguno de los controles negativos (blancos de PCR y blancos de extracción) de los ensayos se obtuvo una concentración de zoosporas que pudiera indicar contaminación durante la PCR o durante la extracción del ADN (ver anexo V: resultados sin procesar de la PCR a tiempo real). En todos los ensayos, los estándares amplificaron y se consideraron válidos todos aquellos cuyas curvas de calibración presentaran coeficientes de determinación R^2 mayores que 0,90 (ver

figuras 9 y 10). Los diagnósticos negativos no necesariamente implican ausencia de zoosporas. Aún cuando es posible, la presencia de falsos negativos producto de detritos o restos de zoosporas que pudieran inhibir la amplificación de ADN (Hyatt y col., 2007), es poco probable debido a que los animales fueron cuidadosamente limpiados con agua antes de tomar la muestra con el hisopo.

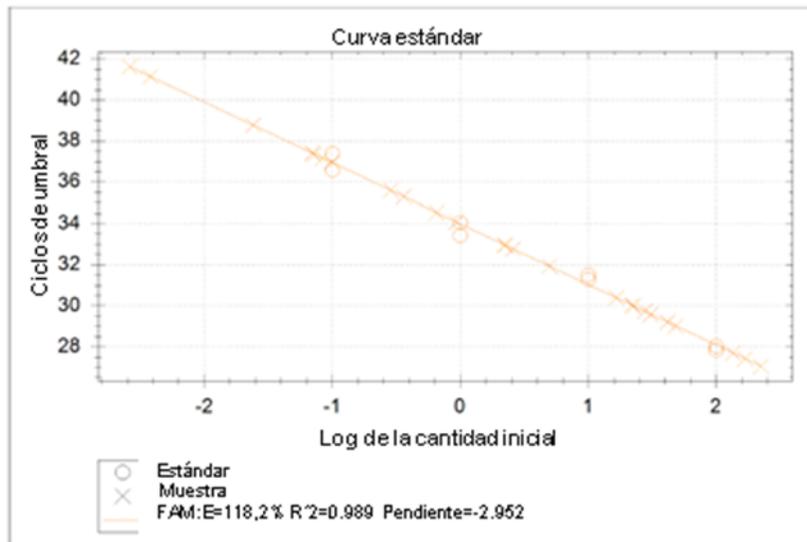


Figura 9. Ejemplo de la curva obtenida con los estándares de *B. dendrobatidis* (círculos) y las muestras (equis) generada por el software CFX Manager versión 1.6, usada para la cuantificación de las zoosporas equivalentes en el análisis de PCR a tiempo real. En el eje x tenemos log. del número de zoosporas vs valor de de C(t) (número de ciclos términos en que empieza a amplificar el ADN, eje y). Se observa además el valor del R².

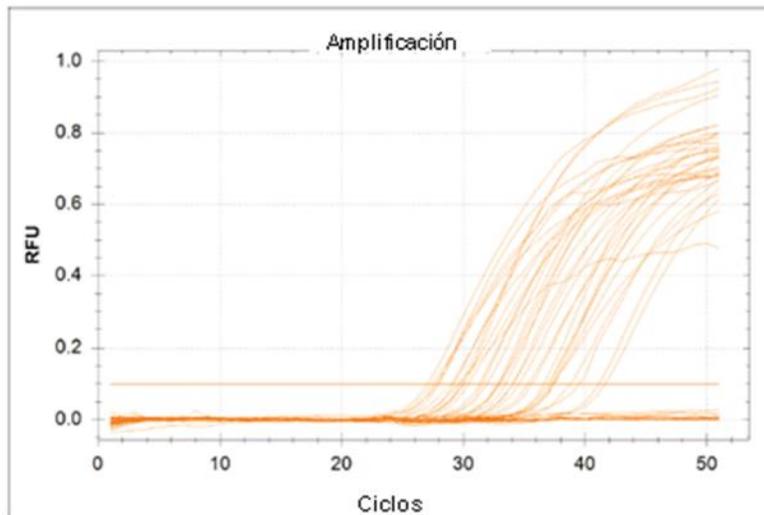


Figura 10. Ejemplo de las curvas de amplificación del ADN de *B. dendrobatidis* que proporciona el software CFX Manager versión 1.6, para diferentes muestras. En el eje x tenemos los ciclos terminos en la PCR a tiempo real en que empieza a amplificar el ADN vs la fluorescencia emitida (RFU). Cada línea representa una réplica de una muestra.

5.4 TASAS DE INFECCIÓN

Cinco individuos de *Dendropsophus meridensis* mostraron diagnósticos positivos antes de que comenzara el ensayo. Estos individuos fueron re-infectados experimentalmente y tratados en los análisis subsiguientes como un grupo separado. Se logró infectar 100% de los individuos *H. crepitans* (controles positivos) como resultado de la exposición experimental a 9×10^6 zoosporas. Esto sugiere que el aislado “Laguna La Esmeralda- Castebeianus -00-LV-1” tiene una actividad similar a la de otros aislados utilizados en ensayos anteriores (Márquez y col. 2010). *D. meridensis* también mostró una susceptibilidad a infectarse similar a la de *H. crepitans*. Cerca del 80% de los individuos de *D. meridensis* mostraron

diagnósticos positivos 18 días después de haber sido expuestos al patógeno (Figura 11).

Las ranas en el grupo control, por el contrario, no mostraron evidencia de infección, a excepción de dos individuos que mostraron diagnósticos positivos en muestras repetidas (animales 13 y 17), probablemente como resultado de infecciones accidentales durante la manipulación de los terrarios; algunos animales lograron escapar de los terrarios durante el mantenimiento y posiblemente entraron en contacto con algún área contaminada antes de ser recuperados. También es posible que alguno de estos renacuajos viniera infectado del campo (Sánchez y col., 2008), y a pesar de que la infección tiende a perderse al desaparecer las estructuras bucales durante la metamorfosis, se re-infectara después de la metamorfosis con zoosporas que no fueron eliminadas durante el cambio de agua. Estos individuos pudieron haber resultado negativos en la muestra inicial debido a que el número de zoosporas durante los primeros días de infección pudiera haber estado por debajo del umbral de detección, y no sería sino posteriormente, cuando la intensidad de infección aumentara, que mostraron diagnósticos positivos.

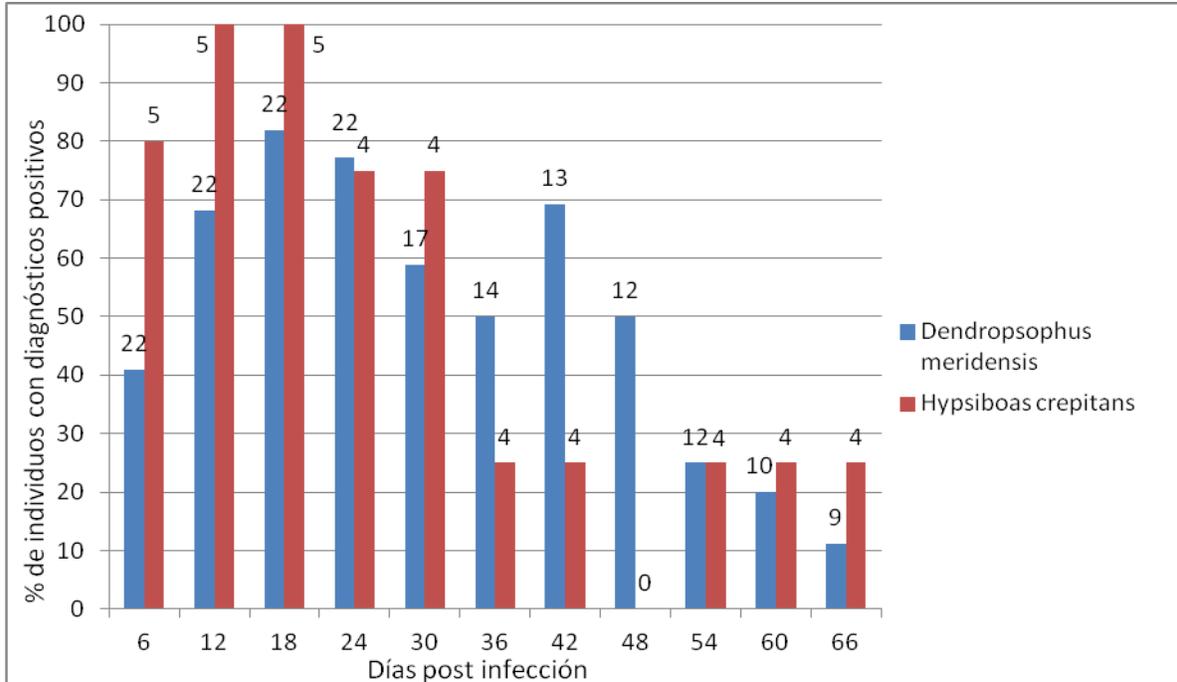


Figura 11. Porcentaje de individuos de *D. meridensis* e *H. crepitans*, con diagnósticos positivos para *B. dendrobatidis*, realizados con análisis de PCR a tiempo real, a lo largo de los 66 días del ensayo. El *n* utilizado para dicho porcentaje diario consistía en el número total de individuos vivos (incluidos infectados y re-infectados) para cada día del ensayo, y está representado en la parte superior de cada barra.

5.5 TASAS DE SUPERVIVENCIA

Mediante una prueba exacta de Fisher, no se encontró una diferencia entre la supervivencia de los infectados y los re-infectados ($p= 0,3602$). Esto permite, considerar a estos dos grupos como uno solo, que llamaremos expuestos. El análisis de las tablas de contingencia mostró que la probabilidad de muerte no fue independiente al tratamiento ($X^2=11,624$; $gl=2$; $p=0,0030$). Por tanto, la infección aumentó la probabilidad de muerte en *D. meridensis*, independientemente de si los animales fueron re-infectados o no. La proporción de ranas del grupo control que sobrevivieron fue mayor que la esperada, mientras que esta proporción fue menor

que la esperada en las ranas infectadas o re-infectadas (Figura 12). La tasa de supervivencia en el grupo control fue alta (93%); sólo uno de los 15 individuos del grupo control de *D. meridensis* murió durante el ensayo (ver anexo VI: Datos de los animales expuestos a *B. dendrobatidis* que murieron durante el ensayo). En el grupo de animales infectados, por el contrario, esta tasa fue menor (47%); sólo ocho de los 17 individuos sobrevivieron durante el ensayo. En el grupo de los re-infectados la supervivencia fue aún menor (20%), sólo uno de los cinco animales re-infectados sobrevivió hasta el final del ensayo. Uno de los animales re-infectados mostró un diagnóstico negativo luego de la exposición al hongo, y murió 24 días después de la exposición. Aún cuando no se observó letargia o posturas anormales en ninguno de las ranas infectadas, en seis de los ejemplares de *D. meridensis* que murieron durante el ensayo se apreció inapetencia días previos a la muerte.

De los cinco adultos de *H. crepitans* que se infectaron experimentalmente, sólo uno murió el día 24, sin signos clínicos de la quitridiomycosis. El número máximo de zoosporas en las muestras de tejido de este ejemplar (472 zoosporas) fue de un orden similar al detectado en los otros ejemplares. Todos los demás individuos eliminaron la infección a partir del día 36.

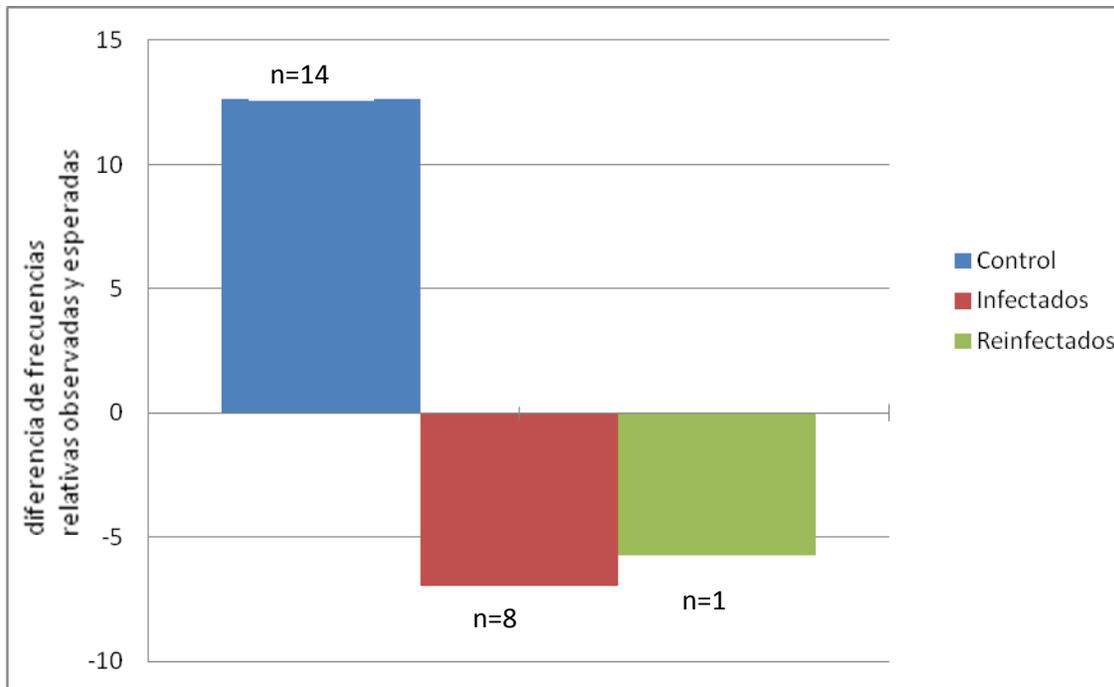


Figura 12. Diferencia de frecuencia relativa entre individuos de *D. meridensis* observados que sobrevivieron y los esperados, luego de la exposición a *B. dendrobatidis*, después de 66 días. Se observa en azul los animales control, en rojo los infectados y en verde los reinfectados.

5.6 PROPORCIÓN DE ANIMALES INFECTADOS

A pesar de que todas las ranas expuestas experimentalmente a *B. dendrobatidis* se infectaron, el porcentaje de ranas comenzó a disminuir a partir del día 18 (Figura 11). De los nueve individuos de *D. meridensis* infectados que sobrevivieron durante el ensayo (ocho infectados y uno re-infectado), sólo en uno de ellos se obtuvo un diagnóstico positivo el día 66 lo que representa un 11% de los animales sobrevivientes (Figura 11); en siete de ellos el número de zoosporas detectado en los días 54, 60 y 66 estuvo por debajo del umbral para considerarlos positivos ($\ll 0,1$); y en el otro animal el número de zoosporas disminuyó hasta tres órdenes de magnitud entre los días 60 y 66, hasta ubicarse por debajo del umbral.

Esto sugiere que la mayor parte de las ranas de *D. meridensis* infectadas fueron capaces de eliminar la infección antes de los 60 días.

5.7 PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN

En las ranas que sobrevivieron durante el ensayo, el número de zoosporas en las muestras de tejido aumentó hasta alcanzar su máximo entre los 18 y 42 días, después del cual tendió a disminuir (Figura 13). Esta disminución no fue monotónica, sino que en algunos casos se observó un segundo pico de menor amplitud hasta que la infección desapareció completamente (Figura 13). En aquellos individuos que presentaron intensidades más bajas, estos picos y valles sucesivos produjeron alternancia de diagnósticos positivos y negativos a lo largo del ensayo. El número de zoosporas detectadas en estos últimos animales osciló alrededor de 0,1 (valor umbral para definir diagnósticos positivos). Solo en dos se observaron zoosporas alrededor de un orden de magnitud de 10. Estas oscilaciones en la intensidad de infección pudieran ser producto del ciclo de vida del patógeno, el cual durante las primeras etapas se aloja en el estrato granuloso y corneo donde se forman los zoosporangios, hecho que disminuye la probabilidad de detectar el hongo con muestras de hisopo. Una vez que completa esta etapa y progresa la infección, el hongo se desarrolla en las células muertas de la superficie de la piel, en donde son liberadas las zoosporas, y su detección es más probable mediante muestras con hisopos (Hyatt y col., 2007).

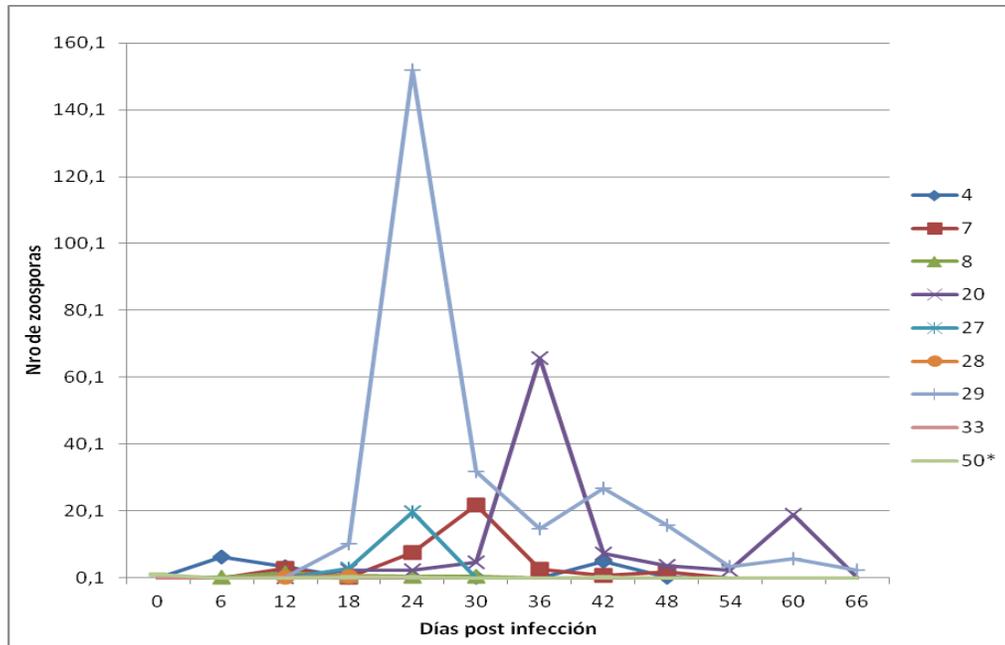


Figura 13. Progresión de la infección en los individuos de *Dendropsophus meridensis* que sobrevivieron durante el ensayo. Con un asterisco (*) aparecen los animales re infectados.

La progresión de infección en las ranas que murieron siguió un patrón parecido al de las ranas que sobrevivieron, hasta el momento en que se produjo la muerte. No parece existir un patrón claro entre la progresión de la infección y la muerte de los individuos. Algunos murieron mientras la intensidad de infección aumentaba (ocho), pero otros murieron después de que la infección comenzara a disminuir (cinco). Más aún, al menos tres animales (18,30 y 53) murieron con menos de 0,1 zoosporas, después de haber alcanzado máximos de hasta tres órdenes de magnitud mayor (Figura 14). Tampoco parece haber una relación clara entre la probabilidad de muerte y el tiempo transcurrido post-infección; varios animales murieron a los 24 días, pero otros murieron al los 30, 42, 48 y 54 días (Figura 14).

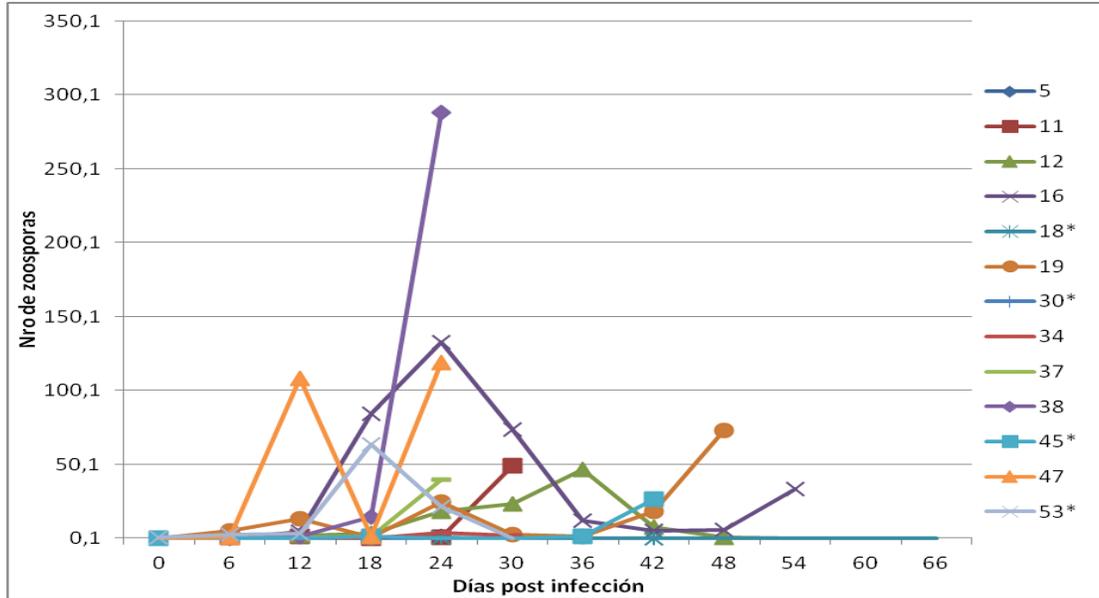


Figura 14. Progresión de la infección de los individuos de *Dendropsophus meridensis* fallecidos durante el ensayo. Con un asterisco (*) aparecen los animales reinfectados.

5.8 INTENSIDAD DE INFECCIÓN Y PROBABILIDAD DE MUERTE

No detectamos diferencias en la intensidad máxima de infección entre las ranas que sobrevivieron y las que murieron ($t=1,01131$; valor $p=0,32947$). La intensidad de infección en muchos de los animales no excedió las 50 zoosporas al momento de la muerte, con un máximo de 288 zoosporas en una rana que murió a los 24 días.

El número de zoosporas equivalentes en las muestras de hisopos de *D. meridensis* varió hasta en tres órdenes de magnitud. En los animales sobrevivientes el máximo observado fue de 152 zoosporas y en los re infectados 63,5 zoosporas. No se encontró diferencia significativa entre las intensidades

máximas de los infectados y reinfectados ($t=1,89042$; valor $p=0,073281$) lo que indica que la intensidad de la infección no varía producto del tratamiento.

En el tejido de los animales muertos, el máximo de zoosporas halladas fue de 18,2 zoosporas. Si comparamos el máximo de zoosporas equivalentes hallado en los animales fallecidos entre las muestras de hisopos y de tejido (tomadas el día de la muerte del animal), se encuentra que existe una diferencia significativa ($t=5,49161$; valor $p=0,00001$). Independientemente de si el animal fue infectado o reinfectado, el máximo de zoosporas observado en las muestras con hisopo fue mayor que en las obtenidas en las muestras de tejido. En fases muy tempranas las muestras de tejido pueden detectar la presencia de *B. dendrobatidis* debido al ciclo de vida del patógeno explicado previamente, el cual hace que la detección sea más efectiva conforme progrese la infección (Hyatt y col., 2007).

El promedio de zoosporas equivalentes halladas en las muestras de hisopos de los animales muertos fue de 14,06 zoosporas (con una desviación estándar de $\pm 38,40$) por animal, mientras que en el tejido fue de 42,47 zoosporas (con una desviación estándar de $\pm 81,18$); y en los animales sobrevivientes el promedio fue de 4,19 zoosporas (desviación estándar de $\pm 20,76$) por individuo.

En *H. crepitans*, las zoosporas llegaron a variar hasta en cuatro órdenes de magnitud, con un máximo de 1340 zoosporas equivalentes observado, y un promedio de $83,68 \pm 217,66$ zoosporas halladas por animal. En el animal fallecido el máximo de zoosporas halladas fue de 472 zoosporas, con un promedio de $191 \pm 232,1$ zoosporas. Estos valores son mayores de los observados en *D.*

meridensis, tanto para individuos muertos como para los sobrevivientes (t=4,32094; valor p =0,000216866).

6. DISCUSIÓN

Los individuos de *Dendropsophus meridensis* evidenciaron ser susceptibles a contraer infección con el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, pero la respuesta ante la infección varió drásticamente entre individuos. Algunas ranas presentaron inapetencia y murieron, mientras que otras mantuvieron infecciones subclínicas hasta que eliminaron el patógeno.

La capacidad de que tienen algunas ranas de eliminar el patógeno, aún en condiciones ideales para su crecimiento, ha sido descrita en varias especies (Lamirande y Nichols, 2001; Bishop y col., 2009). No obstante, se conoce poco sobre los mecanismos de resistencia de los anfibios a la quitridiomycosis (Richmond y col., 2009). Si bien se ha descrito la presencia de péptidos antimicrobianos en las secreciones de la piel de algunos anfibios que protegen al animal durante las fases iniciales de las infecciones con *B. dendrobatidis* y previenen su posterior expansión por la piel (Rollins-Smith y Conlon, 2005), la capacidad de síntesis de dichos péptidos parece estar limitada en algunas especies de hílidos, familia a la cual pertenece *D. meridensis* (Woodhams y col., 2007; Conlon y col., 2009). Por otra parte, al igual que *H. crepitans* (Sánchez y col. 2010), en *D. meridensis* la respuesta ante la infección no se hace evidente sino a partir del día 18, cuando el número de zoosporas ya ha alcanzado un máximo y comienza a disminuir. Esta respuesta tardía parece más cónsona con una respuesta inmune adaptativa que limita la permanencia del patógeno en el

hospedero y, por consiguiente evita el desarrollo a largo plazo de signos clínicos y de la muerte.

A pesar de la capacidad que mostraron algunas ranas para eliminar totalmente la infección, muchas no sobrevivieron a la exposición con *B. dendrobatidis*. La diferencia en las tasas de supervivencia entre individuos expuestos y no expuestos demuestra que la mortalidad observada durante los ensayos estuvo asociada a la exposición con el patógeno. La tasa de supervivencia estimada sugiere que, en condiciones ideales para el crecimiento del patógeno, menos de la mitad de los adultos sobreviven a la infección durante los primeros 60 días. Estas altas tasas de mortalidad parecen contrastar con observaciones en poblaciones silvestres, en las cuales no se encontraron indicios de altas mortalidades o morbilidades, o de disminuciones poblacionales (Sánchez y col. 2009). No obstante, las infecciones endémicas de quitridiomycosis generalmente no son detectables a simple vista en poblaciones de ranas. Por un lado, en algunas especies la enfermedad parece manifestarse durante un lapso muy corto con signos clínicos no muy evidentes, y este es el caso de *D. meridensis*. Por otro lado, las tasas de reclutamiento de algunos anfibios podrían ser suficientemente altas para contrarrestar la mortalidad causada por la enfermedad. Además, las tasas de mortalidad asociadas a la quitridiomycosis en poblaciones silvestres podría ser menor que el observado en el laboratorio. Las condiciones de laboratorio pudieran desfavorecer la respuesta de las ranas ante la exposición ya que algunos animales en cautiverio pueden desarrollar inmunodepresión (Williams 1995; Wright 1996, citado en Pessier y col., 1999).

También se ha demostrado que las ranas pueden utilizar comportamientos que le permiten aumentar su temperatura corporal y combatir al patógeno más eficientemente (Kriger y Hero, 2006; Corn de 2007; Murray y col., 2009; Briggs y col., 2010. Pilliod y col., 2010; Richards-Zawacki, 2010; Voordouw y col., 2010; Conradie y col., 2010). En cautiverio a temperaturas constantes, la posibilidad de emplear esta estrategia está restringida. Es probable entonces que la mortalidad en el laboratorio alcance valores mayores que en condiciones naturales.

Se desconoce si existe un umbral en el número de zoosporas de *B. dendrobatidis* por encima del cual las ranas mueren. En algunas especies se ha obtenido una mortalidad del 100% con dosis de exposición entre las 10^2 - 10^4 zoosporas (Woodhams y col, 2003. Berger y col., 2004,2005; Carey y col., 2006), mientras que en otras se ha reportado una alta mortalidad con dosis más bajas del patógeno (Rollins- Smith y Conlon, 2005). Vredenburg y col. (2011) sugirió que en poblaciones silvestres las disminuciones comienzan a evidenciarse cuando el promedio de zoosporas equivalentes en hisopos supera a 10,000. No obstante, la ausencia de una diferencia significativa entre el número máximo de zoosporas equivalentes entre ranas que sobrevivieron y ranas que murieron infecciones experimentales, sugiere que la probabilidad de que una rana infectada muera no está simplemente determinada por la intensidad de su infección, sino probablemente por una interacción compleja entre varios factores que modulan la vulnerabilidad de cada individuo.

Los estudios sobre la susceptibilidad de las especies ante la exposición a *Batrachochytrium dendrobatidis* permiten predecir el impacto de este patógeno en determinadas comunidades de anfibios y, con base en esta información, establecer prioridades de conservación para regiones particulares. La cordillera de Mérida es una región que requiere de particular atención porque el clima en la mayor parte de extensión favorece al patógeno, y allí habitan una gran proporción de las especies endémicas del país. Nuestro trabajo demuestra que los adultos de *D. meridensis* pueden ser vulnerables a *B. dendrobatidis*, el cual bajo ciertas condiciones, pudiera ocasionar la muerte a más de la mitad de la población expuesta. Además, la ranita merideña comparte su hábitat con *Lithobates catesbeianus*, una especie invasora que actúa como reservorio de *B. dendrobatidis* (Hanselmann y col., 2004; Daszak y col., 2004). Se ha demostrado que la presencia de reservorios de patógenos pudiera promover el desarrollo de epidemias y la extinción local de poblaciones de hospederos (McCallum y Dobson, 1995). Aún cuando la distribución geográfica actual de *D. meridensis* sólo coincide en un 3% con la de *L. catesbeianus*, esta última especie podría expandir su distribución en los próximos años. De ocurrir esta expansión, *D. meridensis* probablemente estaría expuesta a tasas de transmisión de *B. dendrobatidis* mayores a las actuales. A fin de evitar posibles extinciones locales o contracciones en la distribución geográfica de *D. meridensis*, se deben enfocar las estrategias de control de *L. catesbeianus* en las zonas de contacto con *D. meridensis* para evitar un aumento en las tasas de transmisión del patógeno en esta especie.

7. CONCLUSIONES.

- Es posible lograr la manutención de individuos de ranita merideña a partir de estadios larvales, bajo condiciones de 23°C y un fotoperiodo de luz/oscuridad de 12 horas.
- Los individuos de *Dendropsophus meridensis* evidenciaron ser susceptibles a las infecciones experimentales con el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, se obtuvo un 100% de individuos infectados.
- Los individuos de *Dendropsophus meridensis* demostraron ser vulnerables al desarrollo de quitridiomycosis; 59% de los animales infectados murieron antes de los 60 días.
- Salvo inapetencia observada en algunos animales los días previos a la muerte del mismo, no fue posible apreciar algún otro signo clínico que evidencie el desarrollo de la quitridiomycosis.
- La disminución de la carga parasitaria en *Dendropsophus meridensis*, sugieren que esta especie puede recuperarse a la infección de manera espontánea, aun en condiciones óptimas de crecimiento del patógeno.
- No evidenciamos una relación clara entre la intensidad de infección con *Batrachochytrium dendrobatidis* y la probabilidad de muerte de las ranas. Es probable que esta última esté modulado por la interacción entre varios factores.

8. BIBLIOGRAFIA

- Aguirre A., Lampo M. 2006. Protocolo de bioseguridad y cuarentena para prevenir la transmisión de enfermedades en anfibios. Pags. 73- 92 en: Angulo A., Rueda-Almonacid J.V., Rodríguez-Mahecha J.V., La Marca E., Técnicas de Inventario y Monitoreo para los Anfibios de la Región Tropical Andina, Primera Edición, Conservation International, Bogotá, Colombia.
- Alford, R.A., Bradfield K.S., Richards S.J. 2007. Global warming and amphibian losses. *Nature*. **447**: E3-E4.
- Annis, S.L., Dastoor, F.P., Ziel, H., Daszak, P., Longcore, J.E. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *J Wildlife D.* **40**: 420-428.
- Ardipradja, K. 2001. A study of resistance towards the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in 4 species of Australian frogs. Honours thesis. University of Melbourne, Melbourne.
- Barrio-Amorós C.L. 2001. Amphibian decline in Venezuela- the state of knowledge. *Froglog*. **47**: 2-3.
- Barrio-Amorós C.L. 2009. Riqueza y endemismo. Pags. 25-41, en: Molina C., Señaris J.C., Lampo M., Rial A., Anfibios de Venezuela: estado del conocimiento y recomendaciones para su conservación, Gold Reserve, Caracas.

- Beard, K.H., O'Neill, E.M. 2005. Infection of an invasive frog *Eleutherodactylus coqui* by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hawaii. *Biol Conserv.* **126**:591–595
- Bell, R., Gata García, A., Stuart, B., Zamudio, K. 2011. High prevalence of the amphibian chytrid pathogen in Gabon. *Froglog.***95**:11.
- Berger, L., Hyatt, A.D., Speare, R., Longcore, J.E. 2005a. Life cycle stages of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ.* **68**:51-63.
- Berger, L., Marantelli, G., Skerratt, L.F., Speare, R. 2005b. Virulence of the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, varies with the strain. *Dis Aquat Organ.* **68**:47-50.
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D.E., Cunningham, A.A., Goggin, C.L., Slocumbe, R., y col. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *P Natl Acad Sci USA.* **95**: 9031-9036.
- Berger, L., Speare, R., Hines, H., Marantelli, G., Hyatt, A.D., McDonald, K.R., Skerratt, L.F. y colaboradores. 2004. Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Aust Vet J.* **82**:31-36.
- Berger, L., Speare, R., Skerratt, L. 2005c. Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs (*Litoria caerulea*) with severe chytridiomycosis. *Dis Aquat Organ.* **68**:65-70.

- Bishop PJ, Speare R, Poulter R, Butler M, Speare BJ, Hyatt A, et al. 2009. Elimination of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* by Archey's frog *Leiopelma archeyi*. *Dis Aquat Organ*. **84**:9–15.
- Blaustein, A., Romansic, J., Scheessele, E., Han, B., Pessier, A., Longcore, J. 2005. Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conserv Biol*. **19**: 1460-1468.
- Bonaccorso, E., Guayasamin, J.M., Mendez, D., Speare, R. 2003. Chytridiomycosis in a Venezuelan anuran (Bufonidae: *Atelopus cruciger*). *Herp rev*. **34**: 331–334.
- Bosch, J., Martínez-Solano, I., Garcia-Paris, M. 2001. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biol Conserv*. **27**:331–337
- 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. *Dis Aquat Organ*. **60(2)**: 141-148.
- Briggs, C.J., Knapp, R.A., Vredenburg, V.T. 2010. Enzootic and epizootic dynamics of the chytrid fungal pathogen of amphibians. *P Natl Acad Sci USA*. **107**:9695–9700.

- Carey, C., Bruzgul, J.E., Livo, L.J., Walling, M.L., Kuehl, K.A., Dixon, B.F., Pessier, A., y col. 2006. Experimental exposures of boreal toads (*Bufo boreas*) to a pathogenic chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *EcoHealth*. **3**: 5-21.
- Catenazzi, A., Lehr, E., Rodriguez, L., Vredenburg, V. 2011. *Batrachochytrium dendrobatidis* and the collapse of anuran species richness and abundance in the Upper Manu National Park, Southeastern Peru. *Conserv Biol*. **25(2)**: 382-391.
- Cheng, T., Rovito, S., Wake, D., Vredenburg, V. 2011. Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *P Natl Acad Sci USA*. **108(23)**: 9502-9507.
- Corn, P.S. 2007. Amphibians and disease: implications for conservation in the greater Yellowstone ecosystem. Yellowstone. *Science*. **15**:10–16.
- Conradie, W., Weldon, C., Smith, K., Du Preez, L. 2011. Seasonal pattern of chytridiomycosis in common river frog (*Amietia angolensis*) tadpoles in the South African Grassland Biome. *Afr Zool*. **46(1)**: 95-102.
- Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., Green, D.E., Speare, R. 1999. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerg Infect Dis*. **5(6)**: 735-748.

- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife threats to biodiversity and human health. *Science*. **287(21)**: 443-449.
- Daszak, P., Strieby, A., Cunningham, A.A., Longcore, J.E., Brown, C.C., Porter, D. 2004. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetol J*. **14**: 21-27.
- Davidson, E., Parris, M., Collins, J., Longcore, J., Pessier, A., Brunner, J. 2003. Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia*. **3**: 601-607.
- Davidson C., Shaffer H., Jennings M. 2001. Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat and pesticides hypotheses. *Ecol Appl*. **11**: 464-479.
- Duellman, W. y Trueb, L. 1986. Biology og Amphibians. McGraw-Hill.
- Fellers, G., Green, D., Longcore, J. 2001. Oral chytridiomycosis in the mountain yellowlegged frog. *Copeia* **2001**:945-953.
- Fisher, M.C., Bosch, J., Yin, Z., Stead, D., Walker, J., Selway, L., Brown, A. y colaboradores. 2009 Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Mol Ecol*. **18**: 415–429.

- Garcia, T.S., Romansic, J.M., Blaustein, A.R. 2006. Survival of three species of anuran metamorphs exposed to UV-B radiation and the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ.* **72**:163-169.
- Garner, T.W.J., Walker, S., Bosch, J., Leech, S., Rowcliffe, J., Cunningham, A., Fisher, M. 2009. Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Oikos.* **118**, 783–791.
- Gleason, F.H., Letcher, P.M., McGee, P.A. 2008. Freeze tolerance of soil chytrids from temperate climates in Australia. *Mycol Res.* **112**, 976–982.
- Hanselmann, R., Rodríguez, A., Lampo, M., Fajardo-Ramos, L., Aguirre, A.A., Kilpatrick, A.M., Rodriguez, J.P., y col. 2004. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biol Conserv.* **120**: 115-119.
- Hopkins, S., Channing, A. 2002. Chytridiomycosis in Northern and Western Cape frog populations. South Africa. *Froglog.* **54**:1-2.
- Hyatt, A.D., Boyle, D.G., Olsen, V., Boyle, D.B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton, A. y colaboradores. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Organ.* **73**:175-192.

- James, T.Y., Litvintseva, A., Vilgalys, R., Morgan, J. Taylor, J., Fisher, M., Berger, L. y colaboradores. 2009. Rapid global expansion of the fungal disease chytridiomycosis into declining and healthy amphibian populations. *PLoS Path.* **5(5)**: 1-12
- Johnson, M.L., Speare, R. 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Dis Aquat Org.* **65**:181–186
- Jones, K., Patel, N., Levy, M., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J., Daszak, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* **451**: 990-994.
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R. 1998. Effects of introduced bullfrogs and smallmouth bass on microhabitat use, growth, and survival of native red-legged frogs (*Rana aurora*). *Conserv Biol.* **12(4)**: 776-787.
- Kiesecker, J.M., Blaustein, A.R., Miller, C.L. 2001. Potential mechanisms underlying the displacement of native red-legged frogs by introduced bullfrogs. *Ecology.* **82(7)**: 1964-1970.
- Kilpatrick, A., Briggs, C., Daszak, P. 2009. The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends Ecol Evol.* **25(2)**: 109-118.

- Kirshtein, J.D., Anderson, C., Wood, J., Longcore, J., Voytek, M. 2007. Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water. *Dis Aquat Org.* **77**: 11–15.
- Kriger, K.M., Hero, J.M. 2006. Survivorship in wild frogs infected with chytridiomycosis. *EcoHealth.* **3**:171-177.
- Kriger, K.M., Pereoglou, F., Hero J.M. 2007. Latitudinal variation in the prevalence and intensity of chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) infection in Eastern Australia. *Conserv Biol.* **21**: 1280–1290
- Kupferberg, S.J. 1997. Bullfrog (*Rana catesbeiana*) invasion of California river: the role of larval competition. *Ecology.* **78(6)**: 1736-1751.
- Lamirande, E.W., Nichols, D.K. 2002. Effects of host age on susceptibility of cutaneous chytridiomycosis in Blue-and-Yellow Poison Dart frogs (*Dendrobates tinctorius*). Pags. 3- 13 en: McKinnel, R.G., Carlson, D.L., Saint Paul, Minnesota, USA.
- La Marca E. 1998. Biogeografía de los anfibios de la Cordillera de Merida – Andes de Venezuela. Tesis Doctoral. Universidad de Los Andes, Centro de Investigaciones Ecologicas de Los Andes Tropicales (CIELAT).
- La Marca, E., Lips, K.R., Lötters, S., Puschendorf, R., Ibañez, R., Rueda, J., Schulte, R., y col. 2005. Catastrophic population declines and extinctions in

neotropical harlequin frogs (Bufonidae: *Atelopus*). *Biotropica*. **37(2)**: 190-201.

- Lampo, M., Barrios- Amorós, C., Han, B. 2007. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection in the recently rediscovered *Atelopus mucubajiensis* (Anura, Bufonidae), a critically endangered frog from the Venezuelan Andes. *EcoHealth* **3**: 299-302.
- Lampo, M., De Leo, G.A. 1998. The invasion ecology of the toad *Bufo marinus*: from South America to Australia. *Ecol Appl*. **8(2)**: 388-396.
- Lampo, M., Rodríguez, A., La Marca, E., Daszak, P. 2006. A chytridiomycosis outbreak and a severe dry season preceded the disappearance of *Atelopus* species from the Venezuelan Andes. *Herpetol J*. **16(4)**: 395-402.
- Lampo, M., Sanchez, D., Nicolas, A., Marquez, M., Nava-Gonzalez, F., Garcia, C.Z., Rinaldi, M., y col. 2008. *Batrachochytrium dendrobatidis* in Venezuela. *Herp rev*. **39(4)**, 449-454.
- Lips, K.R. 1999. Mass mortality and population declines of anurans at an upland site in western Panama. *Conserv Biol*. **13**:117–125.
- Lips, K.R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J.D., Alford, R.A., Voyles, J., y colaboradores. 2006. Emerging infectious disease and the loss of

biodiversity in a neotropical amphibian community. *P Natl Acad Sci USA*. **103**:3165–3170.

- Lips, K., Burrowes, P., Mendelson, J., Parra-Olea, G. 2005. Amphibian declines in Latin American: widespread population declines, extinctions, and impacts. *Biotropica* **37**: 163-165.
- Lips, K.R., Diffendorfer, J., Mendelson, J. Sears, M. 2008. Riding the wave: Reconciling the roles of disease and climate change in amphibian declines. *PLoS Biol.* **6**: 441–454.
- Longcore, J., Pessier, A., Nichols, D. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. Et sp. nov.. a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*. **91**:219-227.
- Márquez, M., Nava- González, F., Sanchez, D., Calcagno, M., Lampo, M. 2010. Immunological Clearance of *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection at a Pathogen-optimal Temperature in the Hylid Frog *Hypsiboas crepitans*. *Ecohealth*. **7(3)**: 380-388.
- McCallum, H., Dobson, A. 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends Ecol Evol.* **10**: 190–194.
- Mendelson, J.R., Lips, K., Gagliardo, R., Rabb, G., Collins, J., Diffendorfer, J., Daszak, P. 2006. Biodiversity – confronting amphibian declines and extinctions. *Science* **313**: 48.

- Mijares- Urrutia, A. 1998. Los renacuajos de los anuros (Amphibia) altoandinos de Venezuela: Morfología externa y claves. *Rev. biol. trop.* **46**, 119-143.
- Mitchell, K.M., Churcher, T., Garner, T., Fisher., M. 2008. Persistence of the emerging pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* outside the amphibian host greatly increases the probability of host extinction. *Proc R Soc. B* **275**: 329–334
- Morehouse, E., James, T., Ganley, A., Vilgalys, R., Berger, L., Murphy, P., Longcore, J. 2003. Multilocus sequence typing suggests the chytrid pathogen of amphibians is a recently emerged clone. *Mol Ecol.* **12**:395-403.
- Murray, K.A., Skerratt, L.F., Speare, R., McCallum, H. 2009. Impact and dynamics of disease in species threatened by the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conserv Biol.* **23**:1242–1252.
- Muths, E., Corn, P.S., Pessier, A.P., Green, D.E. 2003. Evidence for disease- related amphibian decline in Colorado. *Biol Conserv* **110**:357–365.
- Nichols, D.K., Lamirande, E.W., Pessier, A.P., Longcore, J.E. 2001. Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in dendrobatid frogs. *J Wildlife Dis.* **37(1)**: 1-11.

- Ouellet, M., Mikaelian, I., Pauli, B.D., Rodriguez, J., Green, D.M. 2005. Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. *Conserv Biol.* **19**:1431–1440.
- Padgett- Flohr, G., Hayes, M. 2011. Assessment of the vulnerability of the Oregon spotted frog (*Rana pretiosa*) to the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Herpetological Conservation and Biology.* **6(2)**: 99-106.
- Parris, M.J., Baud, D.R. 2004. Interactive effects of a heavy metal and chytridiomycosis on Gray Treefrog larvae (*Hyla chrysoscelis*). *Copeia* **2004**: 344–350.
- Parris, M., Beaudoin, J. 2004. Chytridiomycosis impacts predator-prey interactions in larval amphibian communities. *Oecologia.* **140**:626-632.
- Parris, M., Cornelius, T. 2004. Fungal pathogen causes competitive and developmental stress in larval amphibian communities. *Ecology.* **85**: 3385-3395.
- Pessier, A., Nichols, D., Longcore, J., Fuller, M. 1999. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates spp.*) and white's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J Vet Diagn Invest.* **11**: 94-199.
- Pilliod, D.S., Muths, E., Scherer, R.D., Bartlet, P.E., Corn, P.S., Hossack, B.R. y colaboradores. 2010. Effects of amphibian chytrid fungus on

individual survival probability in wild boreal toads. *Conserv Biol.* **24 (5)**: 1259-1267.

- Piotrowski, J., Annis, S., Longcore, J. 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia.* **96**: 9-15.
- Pounds, J.A., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, A.J., Fogden, M.P.L., Foster, P.N. y colaboradores. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature.* **439**:161–167
- Puschendorf, R., Bolaños, F., Chaves, G. 2006. The amphibian chytrid fungus along an altitudinal transect before the first reported declines in Costa Rica. *Biol Conserv.* **132**:136–142.
- Rachowicz, L.J., Knapp, R., Morgan, J., Stice, M., Vredenburg, V., Parker, J., Briggs C. 2006. Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology.* **87**, 1671–1683.
- Rachowicz, L.J., Hero, J.M., Alford, R., Taylor, J., Morgan, J., Vredenburg, V., Collins, J. y colaboradores. 2005. The novel and endemic pathogen hypotheses: competing explanations for the origin of emerging infectious diseases of wildlife. *Conserv Biol.* **19**: 1441–1448.

- Rachowicz, L.J., Vredenburg, V.T. 2004. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Dis Aquat Organ.* **61**:75-83.
- Reeder, N., Cheng, T., Vredenburg, V., Blackburn, D. 2011. Survey of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* from montane and lowland frogs in eastern Nigeria. *Herpetology notes.* **4**: 83-86.
- Retallick, R., Miera V. 2007. Strain differences in the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and non-permanent, sub-lethal effects of infection. *Dis Aquat Organ.* **75**:201-207.
- Retallick, R., McCallum, H., Speare, R. 2004. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. *PLoS Biol.* **2**:1965–1971.
- Richards-Zawacki, C.L. 2010. Thermoregulatory behaviour affects prevalence of chytrid fungal infection in a wild population of Panamanian golden frogs. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.* **277**:519–528.
- Richmond, J.Q., Savage, A.E., Zamudio, K.R., Rosenblun, E.B. 2009. Toward immunogenetic studies of amphibian chytridiomycosis: linking innate and acquired immunity. *BioScience.* **59**: 311-320.

- Rivero, J.A. 1961. Salienta of Venezuela. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*: 1-207.
- Rodríguez-Contreras, A., Señaris, J.C., Lampo, M., Rivero, R. 2008. Rediscovery of *Atelopus cruciger* (Anura: Bufonidae) with notes on its current status in the Cordillera de La Costa, Venezuela. *Oryx*. **42**:301–304.
- Rodríguez, J.P., Rojas-Suárez, F. 1995. Libro Rojo De La Fauna Venezolana. PROVITA y Shell Venezuela, S.A., Caracas, Venezuela.
- Rollins-Smith, L.A., Carey, C., Conlon, J.M., Reinert, L.K., Doersam, J.K., Bergman, T. y colaboradores. 2003. Activities of temporin family peptides against the chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) associated with global amphibian declines. *Antimicrob Agents Ch.* **47**:1157–1160
- Rollins-Smith, L.A., Carey, C., Longcore, J., Doersam, J.K., Boutte, A., Bruzgal, J.E., Conlon, J.M. 2002. Activity of antimicrobial skin peptides from ranid frogs against *Batrachochytrium dendrobatidis*, the chytrid fungus associated with global amphibian declines. *Dev Com Immunol.* **26**:471-479.
- Rollins-Smith, L.A., Ramsey, J.P., Reinert, L.K., Woodhams, D.C., Livo, L.J., Carey, C. 2009 Immune defenses of *Xenopus laevis* against *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* **1**:68–91.

- Rollins-Smith, L.A., Woodhams, D.C., Reinert, L.K., Vredenburg, V.T., Briggs, C.J., Nielsen, P.F. y colaboradores. 2006. Antimicrobial peptide defenses of the mountain yellow-legged frog (*Rana muscosa*). *Dev Comp Immunol.* **30**:831–842
- Sánchez, D.A., Chacón-Ortiz, A., León, F., Han, B.A., Lampo, M. 2008. Widespread occurrence of an emerging pathogen in amphibian communities of the Venezuelan Andes. *Biol Conserv.* **141(11)**: 2898-2905.
- Savage, A., Grismer, L., Anuar, S., Kin Onn, C., Grismer, J., Quah., E., Muin, M. y col. 2011. First record of *Batrachochytrium dendrobatidis* infecting four frog families from Peninsular Malaysia. *Ecohealth.* (doi: 10.1007/s10393-011-0685-y)
- Skerratt, L.F., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K.R., Phillott, A.A. y colaboradores. 2007. Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth* **4**:125– 134.
- Stuart, S., Chanson, J., Cox, N., Young, B., Rodrigues, A., Fischman, D., Waller, R. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science.***306**:1783-1786.
- Voordouw, M.J., Adama, D., Houston, B., Govindarajulu, P., Robinson, J. 2010. Prevalence of the pathogenic chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in an endangered population of northern leopard frogs, *Rana pipiens*. *BMC Ecology.* **10(6)**.

- Voyles, J., Young, S., Berger, L., Campbell, C., Voyles, W., Dinudom, A., Cook, D., y col. 2009. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*. **326**: 582-585.
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D. 2007. Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Dis Aquat Org*. **77**: 113–118.
- Vredenburg, V., Knapp, R., Tunstall, T., Briggs, C. 2010. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proc Natl Acad Sci USA*. **107(25)**: 9689-9694.
- Weldon, C., Preez, L., Hyatt, A., Muller, R., Speare, R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerg Infect Dis*. 10:2100-2105.
- Woodhams, D.C., Alford, R.A. 2005. Ecology of chytridiomycosis in rainforests stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conserv Biol*. **19**:1449–1459.
- Woodhams, D.C., Alford, R.A., Marantelli, G. 2003. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis of Aquat Organ*. **55**: 65-67.
- Woodhams, D.C., Ardipradja, K., Alford, R.A., Marantelli, G., Reinert, L.K., Rollins-Smith, L.A. 2007. Resistance to chytridiomycosis varies among

amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Anim Conserv* **10**:409–417.

- Young, B., Lips, K., Reaser, J., Ibañez, R., Salas, A., Cedeño, J., Coloma, L., y col. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Biol Conserv*: **15**: 1213-1223.

Consultas en línea:

- IUCN, Conservation International y NatureServe. Global Amphibian Assessment. [En línea]. 2006. [citado en agosto 2011]. disponible en: www.globalamphibians.org.
- La Marca, E. 2004. *Dendropsophus meridensis*. en: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. <www.iucnredlist.org>. Fecha de acceso: Octubre 2010.

Anexos

Anexo I

Planilla y requerimientos para la solicitud de la Licencia de Caza con Fines Científicos y para el Contrato para el Acceso a los Recursos Genéticos para Investigadores Nacionales y Extranjeros, ante el Ministerio Popular del Ambiente, necesarios para la realización del ensayo.

Planilla requerida para de la Licencia de Caza con fines Científicos.



Gobierno Bolivariano
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular
para el Ambiente



VICEMINISTERIO DE ORDENACIÓN Y ADMINISTRACIÓN AMBIENTAL
Oficina Administrativa de Permisiones

SOLICITUD DE LICENCIA DE CAZA CON FINES CIENTIFICOS

1. Fecha:	2. Renovación:	
	3. Primera vez:	
DATOS DEL SOLICITANTE:		
4. Apellidos:	5. Nombres	
6. C.I:	7. Pasaporte:	
8. Dirección:		
9. Teléfono	10. Fax:	11.

DATOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACION:	
12. Nombre del Proyecto:	
13. Coordinador:	14. C.I. o Pasaporte:
15. Cargo:	16. Institución:
17. Fax:	18. Telf:
19.	

DESCRIPCION DE LOS ESPECIMENES A CAPTURAR (*)			
20. NOMBRE COMUN	21. NOMBRE CIENTIFICO	22. USOS	23. CANTIDAD

(*) De necesitar más espacio, favor anexar lista.

24. Técnicas de Captura:

25. Lugar de Captura:	26. Tiempo de Captura:
27. Destino de los Especímenes:.	
28. Firma del Solicitante:	30. Firma y Sello de la Máxima Autoridad que Avala el Proyecto:
29. Nombre y Cargo de la Máxima Autoridad que Avala el Proyecto:	

REQUISITOS ADJUNTOS:

COPIA DEL PROYECTO AVANCE O RESULTADOS CARTA AVAL Inst. Nac. Inst. Extranj.

Fotocopia cedula.

Estampillas Nacionales del Seniat. (0.02 U.T.) EL EQUIVALENTE A LA UNIDAD TRIBUTARIA VIGENTE.

Requisitos para la solicitud de Contrato de Acceso a los Recursos Genéticos para Investigadores Nacionales y Extranjeros, los cuales han de consignarse ante la Oficina Administrativa de Permisiones los siguientes recaudos para su revisión y análisis.

- Planilla de Solicitud.
- Proyecto elaborado según el siguiente esquema: (Consignar el proyecto en versión electrónica, Formato PDF).
 1. Título
 2. Objetivos.
 3. Duración estimada del Plan de Trabajo.
 4. Significado y relevancia de la propuesta.
 5. Fundamentación y viabilidad.
 6. Metodología a seguir.
 7. Lista de recursos genéticos, productos derivados y componentes intangibles asociados, a los que se pretende acceder. En el caso de recursos genéticos, indicar nombre científico, nombre vulgar y número de muestras.

8. Localización de las áreas donde se realizará el acceso a los recursos indicando las coordenadas geográficas en GPS o UTM. Las coordenadas deberán generar una superficie cuantificable (tres o más puntos).

9. Cronograma de actividades por año.

10. Participantes indicando instituciones y responsabilidades.

11. Descripción de la participación específica de cada uno de los integrantes del Grupo en el Plan de Trabajo.

12. Descripción de los resultados preliminares.

13. Resultados esperados en cada etapa o fase del Plan de Trabajo.

14. Impacto o aplicabilidad de los resultados. Posibles receptores de los productos del Plan de Trabajo. Tipo de actividad y usos que se dará al recurso.

15. Fuentes de financiamiento, debidamente respaldadas.

16. Referencias bibliográficas.

17. Resumen del Plan de Trabajo

18. Currículo de todos los participantes.

- Carta de compromiso de la Contraparte Nacional de apoyo.
- Documento constitutivo de la institución solicitante.
- Declaración jurada del solicitante, consignando que la información suministrada en la presente solicitud es verídica y completa.
- Una garantía de fiel cumplimiento de las obligaciones derivadas de los Contratos de Acceso. Se exceptúan las Universidades y demás Institutos de Investigación del Estado.

Adicionalmente el solicitante deberá realizar una consulta previa e informada de su proyecto a las comunidades locales e indígenas que se encuentren en el área donde pretenda acceder a los recursos genéticos.

Anexo II

Protocolo para realizar medios de cultivos de la mosca *Drosophila melanogaster*.

El siguiente protocolo para la realización de medios de cultivos de la mosca *D. melanogaster* es el establecido en los Laboratorios Docentes de la Escuela de Biología en la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

Receta del Medio de cultivo de las moscas:

- 360 ml de Agua filtrada,
- 44 gr Harina de maíz,
- 4,5 gr Fécula de maíz (Maizina Americana),
- 1,5 gr Levadura granulada,
- 19 gr Papelón, melaza de cana o azúcar,
- Fungicida: 2,5 ml de Vinagre blanco.

Materiales necesarios:

- Frascos de vidrio (como el de compota o mayonesa comercial, pueden ser de diferentes tamaños).

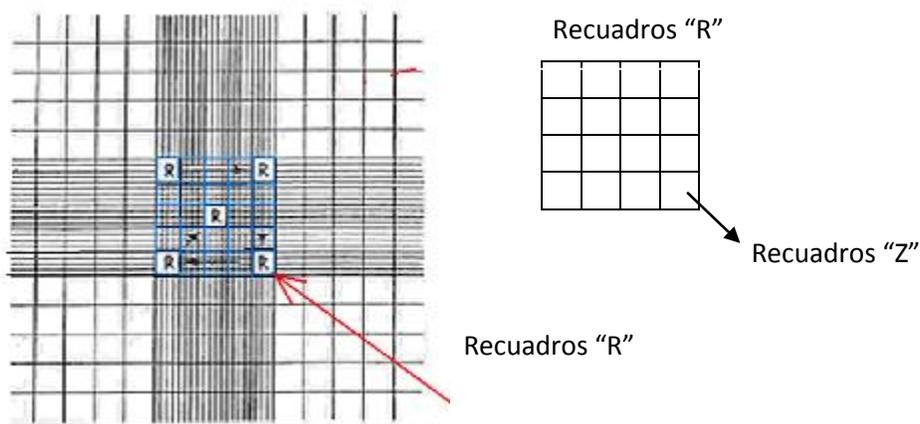
- Algodón

Preparación:

Disolver, calentando y removiendo constantemente, los componentes de la mezcla hasta que hierva, retirar el recipiente del fuego, esperar que deje de hervir, añadir el fungicida y remover vigorosamente. Colocar en una olla de presión por 20 min o 30 seg en el horno microondas un frasco de vidrio y el tapón hecho de algodón. Seguido de esto agregar la mezcla aun liquida al frasco esterilizado, cubrir la boca del frasco inmediatamente con el algodón y esperar que se solidifique y enfríe. Posteriormente, se pueden colocar varias moscas (>10) *D. melanogaster* para que se reproduzcan en este medio. Si se mantienen a una temperatura cercana a 25°C, aproximadamente a las dos semanas, ya están emergiendo las moscas nuevas.

Anexo III

Cuantificación de las zoosporas de *B. dendrobatidis* en el hemocitómetro para el ensayo de infección experimental de *D. meridensis*.



Representación de una de las cámaras del hemocitómetro visto desde el microscopio, por cada recuadro "R", hay 16 recuadros "Z", para un total de 80.

Los hemocímetros son portaobjetos de cristal gruesos con dos cámaras en la superficie superior, de 1mm cada una. Se coloca un cubreobjetos sobre las dos cámaras. Para calcular la concentración de zoosporas de *B. dendrobatidis* en un ml de agua, se colocó una gota del agua con el hongo en el hemocímetro y posteriormente se cuentan los recuadros "Z" de cada recuadro "R", y se totalizan el número de zoosporas contadas. Posteriormente se saca el promedio de zoosporas (que llamaremos "T") por recuadro "Z", dividiendo el total de zoosporas contadas entre el total de recuadros "Z" (80). Para obtener el estimado de zoosporas se utiliza la siguiente fórmula: $T \times 400 \times 10000 =$; la cual nos da el número de zoosporas en un ml. Cuantificación de zoosporas por ml de agua en el hemocímetro:

Conteo	Repeticiones	Zoosporas contadas en cada recuadro "R"	Total zoosporas contadas en "R"	Valor T (total de zoosporas en "R"/80)	T x 400 x 10000=	Promedio de total de zoosporas en un ml.
1	1	40 126 121 167 79	533	6,6625	26650000	13000000
	2	30 22 13 30 28	123	1,5375	6150000	
	3	19 30 19 33 23	124	1,55	6200000	
2	1	11 10 20 13 16	70	0,875	3500000	3500000
	2	11 9 15 17 8	60	0,75	3000000	
	3	19 19 16 12 14	80	1	4000000	

Anexo IV

Preparación de los estándares de *B. dendrobatidis* (basado en Boyle y col., 2004) proporcionados por A. Hyatt (de Australian Animal Health Laboratory-AAHL, Division of Livestock Industries, CSIRO, Victoria, Australia).

- 1) Se siembran placas con medio TGHl con 2 ml de cultivos con crecimiento activo de *B. dendrobatidis* y se incuba durante 4-5 días.
- 2) Las zoosporas se extraen inundando la placa dos veces con 2 ml de solución de DS.
- 3) El número de zoosporas en la solución DS es cuantificado en un hemocitómetro x 4.
- 4) Se centrifuga (13000 rpm) y se obtiene un pellet de 107 zoosporas. Se descarta el sobrenadante y el pellet se re-suspende en 200 µl de Prep- Man Ultra (Applied Biosystems).
- 5) La suspensión se hierve por 10 min, se enfría por 2 min, se centrifuga por 3 min y se remueven 150 µl de sobrenadante.
- 6) El ADN se diluye en agua destilada a 2×10^5 /ml de equivalentes genómicos y las alícuotas se almacenan a -20 °C.
- 7) A partir de este ADN se hacen diluciones seriadas 1/10 para obtener 100, 10, 1 y 0,1 zoosporas, usándose 5 µl por reacción en la PCR a tiempo real.

Recetas de la solución DS:

- KH₂PO₄ a 0.001 M
- MgCl₂ a 0.0001 M
- CaCl₂ a 0.00002 M. Para hacer esta dilución primero hay que preparar dos soluciones stock:

Stock 1 (Stock de Fosfato):

- KH₂PO₄ 136.0 g
- K₂HPO₄ 174.18 g
- (NH₄)₂HPO₄ 132.07 g

- Agua destilada 1000 ml

Stock 2 (Stock de calcio- magnesiu):

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36.76 g

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50.83 g

- Agua destilada 500 ml

- Llevar a pH 7 con KOH

Finalmente, para hacer la solución DS se usa 0.1 ml del stock 2 y 0.5 ml del stock 1 en 1000 ml de agua destilada.

Anexo V

Resultados sin procesar de los análisis diagnósticos en el análisis PCR a tiempo real realizados a las muestras de hisopos de *D. meridensis* e *H. crepitans* expuestos y no expuestos a *B. dendrobatidis*, tomados durante 66 días, incluyendo la toma diagnóstico inicial. Los ejemplares re infectados están identificados con la letra R junto al número de identificación. En **negrilla** aparecen los valores considerados positivos. Los diagnósticos donde no se amplificó el ADN por su ausencia están marcados con el símbolo (*). El símbolo (-) indica que el animal murió y no se realizaron más pruebas. Los valores 0 (cero) son aquellos en los que no hubo amplificación del ADN. Los ejemplares de *H. crepitans* están identificados con una letra C que acompaña al número de identificación.

			02-abr	08-abr	14-abr	20-abr	26-abr	02-may	08-may	14-may	20-may	26-may	01-jun
	Tratamiento	Día 0	Día 6	Día 12	Día 18	Día 24	Día 30	Día 36	Día 42	Día 48	Día 54	Día 60	Día 66
3	No expuesto	0	0,00209	0	0,00202	0	0	0	0	0	0	0	0
6	No expuesto	0,0262	0,00213	0	0	0,000193	0,00183	0,00194	0	0,00367	0	0	0
13	No expuesto	0,0261	0	0,0951	0,0292	2,11	0,128	3,9	0,0379	0,0114	1,07	0,000593	0
17	No expuesto	0	0,226	1,96	0,861	0,0918	0	0,00182	0,888	0,0274	0	0,00254	0,00263
25	No expuesto	0,00581	0,00339	0	0	0	0	0,00722	0	0,0974	0	0	0
26	No expuesto	0	1,47E-05	0	0,000126	0	0	0	0	0,0126	0	0	0
31	No expuesto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	No expuesto	0,00044	0	0	0,0009	0	0	0	0	0	0	0	0
36	No expuesto	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	No expuesto	0,000661	0	0	0,000462	0	0	0	0	0	0	0	0
41	No expuesto	0	0,00105	0	0,000734	0	0	0	0	0	0	0	0,000648
43	No expuesto	0,000126	7,8E-06	0	0,000103	0	0	0	0	0,00829	0	0	0
48	No expuesto	0,002	0,000929	0	0,00044	0	0	0,00208	0	0	0	0	0
51	No expuesto	0,00148	0,00174	0	0,000931	0	0	0	0	0	0,00307	0	0
54	No expuesto	0,00161	0,00168	0	0,000344	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Expuesto	0	6,3	3,26	0,215	0,0371	0,123	0*	4,9	0,315	0,0123	0	0

5	Expuesto	0,0438	0,462	0,00541	0,0423	1,38	-	-	-	-	-	-	-
7	Expuesto	0	0	2,98	0,102	7,68	21,9	2,5	0,819	1,71	0,0202	0,00529	0
8	Expuesto	0,084	0,185	1,54	0,644	0,553	0,485	0,0116	0,0111	0,0144	0	0	0
11	Expuesto	0	0,451	1,35	0,262	0,724	48,9	2,72	-	-	-	-	-
12	Expuesto	0,000302	0,0212	2,08	3,26	18,2	23,2	46,6	7,81	0,599	0	0	-
16	Expuesto	0	0,0369	4,48	84,4	133	73,9	12,1	5,13	5,57	33,6		-
18R	Expuesto	0,149	0,0212	0,0368	0,00538	0,793	0,0279	0,00935	0,12	0,033	0	0	0,00218
19	Expuesto	0,000166	4,93	13,4	0,369	24,8	2,24	1,13	18,5	73,1	-	-	-
20	Expuesto	0,000234	0,00436	0,34	2,2	2,42	4,61	65,9	7,28	3,62	2,3	18,9	0,0922
27	Expuesto	0,000265	6,56E-05	0,0203	2,83	19,6	0,032	0,031	0,0154	0,0292	0	0	0
28	Expuesto	0,000565	0,000386	0,225	0,574	0,0712	0,0238	0,0291	0	0,0669	0,00853	0	0
29	Expuesto	0	0,0388	0,0827	10,1	152	31,9	14,8	26,7	15,8	3,27	5,67	2,39
30R	Expuesto	0,157	0,00103	0,0627	0	0,00319	-	-	-	-	-	-	-
33	Expuesto	0,00265	0,0132	0,303	0,0104	0,00241	0,0146	0	0	0,0218	0	0	0
34	Expuesto	0,000248	0,352	0,948	0,15	3,59	1,74	-	-	-	-	-	-
37	Expuesto	0,000339	0,0163	0,415	1,04	39,6	-	-	-	-	-	-	-
38	Expuesto	5,89E-05	0,217	1,51	14,5	288	-	-	-	-	-	-	-
45R	Expuesto	0,179	0,0286	0,0311	1,22	0,0453	0*	1,48	26,2	-	-	-	-
47	Expuesto	0,000231	0,36	108	1,03	119	-	-	-	-	-	-	-
50R	Expuesto	0,927	0,00139	0,0012	0,214	0,344	0,0305	0*	0,254	0,00867	0,00101	0	0,0318
53R	Expuesto	0,448	2,25	3,02	63,5	21,2	4,61E-05	-	-	-	-	-	-
1c	Expuesto	4,5	631	1340	45,4	0,546	0,0471	0,00753	0,00262	0,00376	0,0527	0	0,000517
2c	Expuesto	0,000006	1,18	30	79,9	1,02	148	22,2	42,3	0*	17,1	0,84	0,894
3c	Expuesto	0,00196	0,0535	1,29	22,5	23,3	0,344	0,00097	0	0	0,0016	0	0
4c	Expuesto	1,02	228	373	81,6	0*	0,349	0,0423	0	0	0	0	0
5c	Expuesto	0,00598	292	472	1,35	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo VI

Datos de los animales expuestos a *B. dendrobatidis* que murieron durante el ensayo

Animal	Especie	Tratamiento	Fecha de muerte	Día de ensayo	Nro. de zoosporas en tejido	Nro. de zoosporas antes de morir
5	<i>D. meridensis</i>	infectado	24-abr	28	0	1,38
30	<i>D. meridensis</i>	infectado	24-abr	28	0	0,00319
37	<i>D. meridensis</i>	infectado	24-abr	28	0	39,6
38	<i>D. meridensis</i>	infectado	24-abr	28	0,00348	288
47	<i>D. meridensis</i>	infectado	24-abr	28	0,0172	119
34	<i>D. meridensis</i>	infectado	28-abr	32	0,562	1,74
53	<i>D. meridensis</i>	infectado	28-abr	32	0,0041	0,0000461
11	<i>D. meridensis</i>	infectado	02-may	36	0,742	48,9
45	<i>D. meridensis</i>	infectado	07-may	41	0,183	1,48
19	<i>D. meridensis</i>	infectado	14-may	48	5,22	18,5
16	<i>D. meridensis</i>	infectado	23-may	57	18,2	33,6
12	<i>D. meridensis</i>	infectado	26-may	60	0,00814	0
41	<i>D. meridensis</i>	control	30-may	64	0	0
5	<i>H. crepitans</i>	infectado	30-may	64	0,00362	1,31
18	<i>D. meridensis</i>	infectado	01-jun	66	0	0

Anexo VI

Resultados del procesamiento estadístico (con el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.11) de los datos obtenidos en la infección experimental de individuos de *D. meridensis* e *H. crepitans* con el hongo patógeno *B. dendrobatidis*.

1. Comparación del número de animales muertos y vivos durante todo el ensayo para todos los tratamientos:

Tabla de contingencia tratamiento x supervivencia.

<i>D. meridensis</i>	Sobrevivientes	Fallecidos	Total
Control	14	1	15
Expuestos	8	9	17
Reinfectados	1	4	5
Total	23	14	37

Pruebas de independencia entre tratamientos y supervivencia

<i>Prueba</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Gl</i>	<i>Valor-P</i>
Chi-Cuadrada	11,624	2	0,0030

2. Comparación entre las máximas cargas parasitarias halladas en los hisopos de los individuos de *D. meridensis* que murieron durante el ensayo y los sobrevivientes.

Tabla donde se aprecia el Log del máximo de zoosporas halladas en los animales muertos y sobrevivientes.

Animal	Log del máximo de zoosporas halladas	Estado
5	2,046885191	Muerto
11	3,592509848	Muerto
12	3,571592383	Muerto
16	4,026982443	Muerto
18	1,809155532	Muerto
19	3,767081621	Muerto
30	0,939718882	Muerto
34	2,459693976	Muerto
37	3,500922239	Muerto
38	4,362501324	Muerto
45	3,32159843	Muerto
47	3,978682565	Muerto
53	3,705949195	Muerto
4	2,703291378	Vivo
7	3,243781916	Vivo
8	2,094121596	Vivo
20	3,722057771	Vivo
27	3,195622944	Vivo
28	2,281941933	Vivo
29	4,084969288	Vivo
33	1,402089351	Vivo
50	1,875986771	Vivo

Resultados arrojados por el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.11):

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $media1 = media2$

Hipótesis Alt.: $media1 <> media2$

suponiendo varianzas iguales: $t = 1,01131$ valor-P = 0,323947

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

3. Comparación entre las máximas cargas parasitarias halladas en los hisopos de los individuos de *D. meridensis* infectados y re infectados.

Tabla donde se aprecia el Log del máximo de zoosporas halladas en los animales infectados y re infectados.

Animal	Log del máximo de zoosporas halladas	Estado
18	1,809156	Reinfectado
30	1,13226	Reinfectado
45	3,321598	Reinfectado
50	1,875987	Reinfectado
53	3,705949	Reinfectado
4	2,046885	Infectado
5	3,243782	Infectado
7	2,094122	Infectado
8	3,59251	Infectado
11	3,571592	Infectado
12	4,026982	Infectado
16	3,767082	Infectado
19	3,722058	Infectado
20	3,195623	Infectado
27	2,281942	Infectado
28	4,084969	Infectado
29	1,402089	Infectado
33	2,459694	Infectado
34	3,500922	Infectado
37	4,362501	Infectado
38	3,978683	Infectado
47	3,978683	Infectado

Resultados arrojados por el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.11):

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $media1 = media2$

Hipótesis Alt.: $media1 <> media2$

suponiendo varianzas iguales: $t = 1,89042$ valor-P = 0,0732813

No se rechaza la hipótesis nula para $\alpha = 0,05$.

4. Comparación entre las máximas cargas parasitarias hallada en el tejido de los individuos de *D. meridensis* que murieron durante el ensayo y en el máximo de los hisopos de cada individuo muerto.

Tabla donde se aprecia el Log del número de zoosporas del tejido animales muertos y el máximo obtenido en muestras de hisopos

Animal	Log del máximo de zoosporas halladas	Muestra
5	0,028343473	Tejido
11	1,780749231	Tejido
12	0,21779968	Tejido
16	3,163459552	Tejido
18	0	Tejido
19	2,621799224	Tejido
30	0	Tejido
34	1,66238002	Tejido
37	0	Tejido
38	0,106666762	Tejido
45	1,194236749	Tejido
47	0,375846436	Tejido
53	0,123198075	Tejido
5	2,046885191	Hisopo
11	3,592509848	Hisopo
12	3,571592383	Hisopo
16	4,026982443	Hisopo
18	1,809155532	Hisopo
19	3,767081621	Hisopo
30	0,939718882	Hisopo
34	2,459693976	Hisopo
37	3,500922239	Hisopo
38	4,362501324	Hisopo
45	3,32159843	Hisopo
47	3,978682565	Hisopo
53	3,705949195	Hisopo

Resultados arrojados por el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.11):

Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: $media1 = media2$

Hipótesis Alt.: $media1 <> media2$

suponiendo varianzas iguales: $t = -5,4916$ valor-P = 0,00001