



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA, ECOLOGÍA Y GESTIÓN

Prevalencia e intensidad de tres enfermedades infecciosas en ranas del género *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae), en varias localidades de las provincias Azuay y Cañar al Sur de los Andes ecuatorianos

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA Y GESTIÓN

Autores:

ERVIN ROLANDO RAMIREZ PIEDRA
CHRISTIAN IVÁN VILLALTA SANMARTÍN

Director:

David Christopher Siddons

Asesores Metodológicos:

Verónica L. Urgilés

Anna E. Savage

CUENCA-ECUADOR

2020

DEDICATORIA

A mi mami Sonia y mi papi Rolando por su amor, sacrificio, por todos los consejos y por tener siempre presente mi bienestar. Por disponer su vida ante sus hij@s.

A mis herman@s Melissa, Arellys, Adriana, Daniel, quienes me recuerdan las dificultades y lo lindo de ser niño; a mis hermanas mayores Karina, Deiby y Juleysi, quienes han pavimentado el camino frente a mí.

A mi tía Doris, que siempre conoció mi gusto por la biología y me supo motivar.

Ervin

A mi madre, mi tía Guadalupe y mis abuelitos Blanca y José, por su apoyo y consejos en toda mi etapa universitaria. Y por creer en mí.

A mis hermanos Darío, Brandon, Paúl, Andrea y Mariel, por ser mi motivo de superación.

A mi gran amigo Eduardo Campoverde, por su PACIENCIA y apoyo incondicional en cada paso.

Christian

AGRADECIMIENTOS

A nuestro director de tesis David Christopher Siddons, por su guía durante este proyecto y su continua predisposición. Por su comprensión y actitud positiva.

A nuestra gran amiga Verónica Urgilés por su inmenso apoyo en toda esta etapa. Por contribuir con el financiamiento para el presente trabajo, mediante la gestión de becas. Por realizar los análisis moleculares de todo el material colectado en campo. Y por sus múltiples sugerencias durante la redacción de este manuscrito.

A Anna Savage por financiar el trabajo de laboratorio y por sus recomendaciones en el análisis de resultados.

A Rodrigo Caroca y Boris Tinoco por sus revisiones y comprensión.

Este estudio fue financiado por una beca Young Explorers de la National Geographic Society, y por una beca del Explorers Club. Los exámenes moleculares fueron realizados en SAVAGE LAB, University of Central Florida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE ANEXOS	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: METODOLOGÍA	4
1.1 Área de estudio.....	4
1.2 Materiales y métodos	7
1.2.1 Recolección de datos.....	7
1.2.2 Análisis de laboratorio.....	7
1.2.3 Identificación de especies.....	8
1.2.4 Análisis de datos.....	8
CAPÍTULO 2: RESULTADOS	9
2.1 Prevalencia de infección	9
2.2 Intensidad de infección	12
CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN	14
3.1 Prevalencia e intensidad de infección por <i>Bd</i>	14
3.2 Prevalencia e intensidad de infección por <i>Pr</i>	15
3.3 Prevalencia e intensidad de infección por <i>Rv</i>	16
3.4 Intensidad de Infección	17
3.5 Coinfección	17
3.6 Historia natural de ranas terrestres y su exposición a los patógenos	17
3.7 Consideraciones finales.....	18
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	19
REFERENCIAS	20
ANEXOS	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudio.	6
Figura 2. Prevalencia de <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> , <i>Ranavirus</i> y <i>Perkinsea</i> por localidades.	11
Figura 3. Intervalos de confianza Clopper-Pearson.	12
Figura 4. Prevalencia y logaritmo natural de la intensidad de infección por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> , <i>Ranavirus</i> y <i>Perkinsea</i> , según elevación.	13

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas, elevación y tipo de ecosistema perteneciente a cada localidad.	5
Tabla 2. Número de individuos infectados por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (<i>Bd</i>), <i>Ranavirus</i> (<i>Rv</i>) y <i>Perkinsea</i> (<i>Pr</i>).	10
Tabla 3. Valores del test chi-square para prevalencia de infección.	10
Tabla 4. Promedio de intensidad de infección en base a los positivos, para <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (<i>Bd</i>), <i>Ranavirus</i> (<i>Rv</i>) y <i>Perkinsea</i> (<i>Pr</i>).	12
Tabla 5. Valores del test chi-square para intensidad de infección.	13

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Curva estándar de concentraciones conocidas (qPCR) de <i>Bd</i>	33
Anexo 2. Ajuste en base a la curva estándar de <i>Bd</i>	33
Anexo 3. Curva estándar de concentraciones conocidas (qPCR) de <i>Rv</i>	34
Anexo 4. Ajuste en base a la curva estándar de <i>Rv</i>	34
Anexo 5. Curva estándar de concentraciones conocidas (qPCR) de <i>Pr</i>	35
Anexo 6. Ajuste en base a la curva estándar de <i>Pr</i>	35
Anexo 7. Secuencias, estándares, sondas y primers utilizados en cada reacción de qPCR.	36

Prevalencia e intensidad de tres enfermedades infecciosas en ranas del género *Pristimantis* (*Anura: Strabomantidae*), en varias localidades de las provincias Azuay y Cañar al Sur de los Andes ecuatorianos

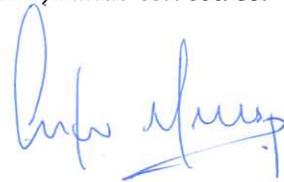
RESUMEN

Los anfibios han experimentado constantes descensos poblacionales durante las últimas décadas. Múltiples factores han sido reconocidos como causa de este declive, entre los que destacan las enfermedades infecciosas emergentes. Los distintos eventos de mortalidad por enfermedades infecciosas en poblaciones de anfibios pueden atribuirse a tres microorganismos: *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), *Ranavirus* (*Rv*) y un protista similar a *Perkinsea* (*Pr*). Investigamos la prevalencia e intensidad de infección de estos tres patógenos en ranas del género *Pristimantis* y su relación con variables biogeográficas y ambientales usando métodos no invasivos de colección (swabs) y protocolos moleculares basados en PCR cuantitativos. Encontramos presencia de *Bd*, *Rv* y *Pr*, sin embargo la prevalencia de infección fue baja. Encontramos diferencias significativas en la prevalencia de *Pr* entre localidades y a través de un gradiente de elevación y en la prevalencia de *Bd* entre localidades. Nuestros resultados representan el primer reporte de *Ranavirus* y *Perkinsea* en el país.

Palabras clave: *Quitridiomycosis, Perkinsea, Ranavirus, patógenos, ranas terrestres.*



David Christopher Siddons
Director del trabajo de Titulación



Antonio Manuel Crespo Ampudia
Coordinador de Escuela



Ervin Rolando Ramírez Piedra



Christian Iván Villalta Sanmartín

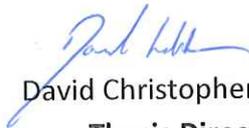
Autores

Prevalence and intensity of three infectious diseases in frogs of the genus *Pristimantis* (*Anura: Strabomantidae*) in several locations in Azuay and Cañar in the southern Ecuadorian Andes

ABSTRACT

Amphibians have experienced constant population declines in recent decades. Multiple factors have been recognized as a cause among which emerging infectious diseases stand out. The different mortality events due to infectious diseases in amphibian populations around the planet can be attributed mostly to three microorganisms: *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), *Ranavirus* (*Rv*) and a protist similar to *Perkinsea* (*Pr*). The prevalence and intensity of infection of these three pathogens in frogs of the genus *Pristimantis* and their relationship with biogeographic and environmental variables were investigated by using non-invasive collection methods (swabs) and molecular protocols based on quantitative PCR. *Bd*, *Rv* and *Pr* were found. However, the prevalence of infection was low. Significant differences were found in the prevalence of *Pr* between localities and through a gradient of elevation and in the prevalence of *Bd* between localities. The results represent the first report of *Ranavirus* and *Perkinsea* in the country.

Keywords: *Chytridiomycosis, Perkinsea, Ranavirus, pathogens, land frogs.*



David Christopher Siddons
Thesis Director



Antonio Manuel Crespo Ampudia
Faculty Coordinator



Ervin Rolando Ramírez Piedra



Christian Ivan Villalta Sanmartin

Authors

Ramírez Piedra Ervin Rolando

Villalta Sanmartín Christian Iván

Trabajo de Graduación

Siddons David Christopher, MSc.

Febrero 2020

Prevalencia e intensidad de tres enfermedades infecciosas en ranas del género *Pristimantis* (*Anura: Strabomantidae*), en varias localidades de las provincias Azuay y Cañar al Sur de los Andes ecuatorianos

INTRODUCCIÓN

Los anfibios han experimentado altas tasas de disminución poblacional y extinción de especies en todos sus hábitats conocidos (Alroy, 2015; Collins, 2003). Las actividades humanas se han identificado como responsables principales de este declive al producir cambios acelerados en los entornos naturales, resultando en la variación de patrones climáticos, así como en la destrucción y fragmentación de grandes extensiones de hábitat (Jones et al., 2008; Rohr & Raffel, 2010; Wake & Vredenburg, 2008). Las enfermedades infecciosas también han desempeñado un rol importante en la mortalidad de anfibios, documentándose que desde la década de 1970, enfermedades patogénicas emergentes han afectado a un gran porcentaje de especies de anfibios y han sido reportadas en casi todos los continentes (Berger et al., 1998; Daszak et al., 1999; Grant et al., 2016). Las enfermedades infecciosas emergentes son causadas por nuevos patógenos, o por patógenos que recientemente han aumentado su incidencia y distribución hacia nuevas regiones geográficas afectando a nuevos huéspedes (Daszak et al., 2000). Recientemente, Isidoro-Ayza et al. (2017) han señalado a *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Ranavirus* y a un protista no-identificado similar a *Perkinsus* como los causantes de las tres enfermedades infecciosas emergentes más comunes en anuros y que han sido relacionadas con declives poblacionales en distintas regiones del mundo. Sin embargo, la presencia de estos patógenos en determinados grupos de anfibios y regiones geográficas, particularmente en los trópicos, no ha sido completamente analizada. En ese contexto, es importante estudiar la prevalencia de estas enfermedades en especies silvestres y entender su relación con factores medioambientales para informar estrategias locales y regionales de conservación (Medina-Vogel, 2010).

Batrachochytrium dendrobatidis (en adelante *Bd*), es un hongo patógeno que causa la quitridiomycosis, una enfermedad altamente virulenta (Skerratt et al., 2007) de amplia distribución geográfica, que ha sido reportada en todos los continentes (excepto antártica, donde no hay anfibios) (Catenazzi et al., 2010). *Bd* ha sido identificado como una de las principales causas del declive de muchas poblaciones de anfibios a nivel mundial, pero sus

efectos han sido particularmente dramáticos en los trópicos (Catenazzi et al., 2010). *Bd* presenta un amplio rango de especies hospederas, y potencialmente tendría la capacidad de sobrevivir de manera independiente, sin un huésped (Daszak et al., 2003). *Ranavirus* (en adelante *Rv*) es un género perteneciente a la familia Iridoviridae, los cuales representan un diverso grupo de virus grandes de ADN bicatenario, conocidos por causar infección a vertebrados que incluyen peces, anfibios y reptiles (Brenes et al., 2014; Williams et al., 2005). Se han reportado infecciones por *Rv* y eventos de mortalidad asociados en anfibios de América del Norte y del Sur, Europa, África y Asia (Duffus et al., 2015). La mayoría de eventos de mortalidad reportados son de Norteamérica (Greer & Collins, 2008; Jancovich et al., 2005), con brotes de infección significativamente más altos a mediados o fines de verano, lo que coincide con aumentos de temperatura y con épocas reproductivas en anuros (Green et al., 2002). *Perkinsea* (en adelante *Pr*) es conocida solamente desde hace dos décadas, siendo detectada por primera vez en 1999 (Davis et al., 2007). Es un patógeno protista aún no descrito, genéticamente similar a *Perkinsus* (Davis et al., 2007), provoca la infección severa de *Perkinsea* (SPI, siglas en inglés) una enfermedad emergente responsable de múltiples casos de mortalidad a lo largo de los Estados Unidos de América (Isidoro-Ayza et al., 2017).

Distintas especies de anfibios responden de manera diferente a estos tres patógenos, pudiendo en algunos casos ser tolerantes y presentar únicamente efectos subletales, pero con la capacidad potencial de infectar a otros individuos en la comunidad (Brannelly et al., 2018; Brunner et al., 2004; Isidoro-Ayza et al., 2017). Por ejemplo, especies introducidas como la rana toro americana (*Lithobates catesbeianus*) y la rana africana de garras (*Xenopus laevis*), son portadoras potenciales de *Bd* y *Rv* y eventualmente podrían actuar como vectores de estas enfermedades con especies nativas (Fisher & Garner, 2007; Robert et al., 2007). En la mayoría de los casos de infección por estos patógenos externamente no se evidencia ningún tipo de anormalidad, por lo que su presencia puede ser comprobada eficazmente mediante análisis moleculares (Driskell et al., 2009; Isidoro-Ayza et al., 2017; Kriger et al., 2007). Son necesarios exámenes histológicos para la confirmación de efectos negativos en la salud (enfermedad) por *Ranavirus* y *Perkinsea* (Driskell et al., 2009; Isidoro-Ayza et al., 2019). El uso de técnicas moleculares para detectar la presencia de estos patógenos es una herramienta eficaz para el monitoreo de poblaciones en estado silvestre (Kriger et al., 2006). Adicionalmente, ha sido demostrado que la técnica de recolección de muestras con swabs es viable, sobre todo cuando se busca un muestreo no destructivo y no invasivo para la detección de *Bd*, *Rv* y *Pr* (Karwacki et al., 2018; Retallick et al., 2006; Rivera et al., 2019).

Estudios recientes sobre la procedencia de *Bd* apoyan la hipótesis que este hongo se originó en Asia (Byrne et al., 2019; O'Hanlon et al., 2018). O'Hanlon et al. (2018) mediante análisis de secuencias completas de genoma, estimaron que el ancestro del linaje panzoótico BdGPL apareció entre 50 y 120 años atrás. Byrne et al. (2019) ratificaron que el linaje panzoótico global BdGPL predomina en el continente americano, siendo el único linaje reportado en Ecuador. La propagación mundial de este patógeno, altamente virulento y transmisible, tuvo lugar en el

siglo XX y coincide con el desarrollo en gran escala del comercio intercontinental que inició hacia 1820 (O'Rourke & Williamson, 2002) así como la expansión del comercio global de anfibios como mascotas y para fines médicos y alimenticios (Fisher & Garner, 2007). En anfibios *Bd* se alimenta de la queratina presente en la piel, por lo que afecta mayormente a individuos adultos (Fellers et al., 2001). Tempranamente, afectan a las larvas en la zona bucal, pues es la única que contiene esta proteína en las primeras etapas de desarrollo (Fellers et al., 2001). La afección interrumpe el funcionamiento normal de la piel, de manera que los individuos afectados pierden electrolitos y la capacidad de homeostasis, pudiendo ser la quitridiomycosis causa de muerte (Voyles et al., 2007).

Cuando existen cargas patogénicas fuertes, los individuos afectados por *Rv* pueden presentar necrosis generalizada, mayormente en hígado, bazo, riñón e intestinos (Bollinger et al., 1999), mientras que *Pr* ataca variedad de tejidos, siendo los más afectados hígado, bazo, riñón y páncreas (Isidoro-Ayza et al., 2019).

En Ecuador existen informes previos de presencia de *Bd* (Cáceres-Andrade, 2014; Guayasamin et al., 2014; Mccracken et al., 2009; Ron & Merino-Viteri, 2000) y hasta donde sabemos, *Rv* y *Pr* no han sido evaluadas. Entre los anuros más afectados se encuentra el género *Atelopus*, del cual 16 de las 25 especies registradas en el país están consideradas en peligro crítico (IUCN, 2020). Por ejemplo, *Atelopus ignescens* era considerada una especie abundante en los altos Andes en las provincias de Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo y Bolívar (Coloma et al., 2000; Ron & Merino-Viteri, 2000). Sin embargo, a finales de los años 1980s sus poblaciones disminuyeron dramáticamente hasta el punto de ser considerada extinta en la Lista Roja de la IUCN, hasta el redescubrimiento de una población en 2016 (Varela-Jaramillo et al., 2018). De manera similar, *Atelopus bomolochos* y *Telmatobius niger* han sufrido descensos poblacionales en Ecuador. Ron & Merino-Viteri (2000) sugieren en base a la información disponible que *Bd* ha sido una de las causas. Otro estudio realizado en tierras bajas de la Amazonía, en áreas circundantes a la Estación de Biodiversidad Tiputini (Aguarico, Orellana) confirma la presencia de *Bd* en tres géneros de anuros, *Engystomops*, *Leptodactylus* y *Pristimantis*. Dentro de éste último género, las especies analizadas fueron *P. aureolineatus*, *P. waoranii*, *P. ockendeni* y *P. lanthanites* (Mccracken et al., 2009). Sin embargo, pese a ser positivos para *Bd*, no se evidenció eventos de mortalidad asociados o signos externos en ninguna de estas especies (Mccracken et al., 2009).

Las ranas terrestres del género *Pristimantis* son altamente diversas y representan casi un 38% de la diversidad total de anfibios en los ecosistemas altoandinos de Ecuador (Ron et al., 2018). Una de las características más interesantes de éste género es su sistema de reproducción directa, que no requiere cuerpos de agua para el desarrollo (Lynch & Duellman, 1997). A pesar de que este grupo de anfibios es un importante representante de la diversidad de la región, los estudios enfocados en detectar patógenos en latinoamérica se han centrado en especies con fase larvaria como las familias Bufonidae, Hylidae, Dendrobatidae (Blaustein et al., 2018), mientras que las investigaciones en ranas terrestres de desarrollo directo han sido escasas. En

el Sur del Ecuador únicamente un estudio exploratorio llevado a cabo por Cáceres-Andrade (2014) ha analizado la presencia de *Bd* en la comunidad de anfibios del Parque Nacional Cajas, incluyendo a varias especies de *Pristimantis*. Sin embargo, aún necesitamos más estudios enfocados en determinar la prevalencia de enfermedades patogénicas en otras regiones del Sur del Ecuador. Adicionalmente, es esencial generar información sobre las dinámicas de la infección y determinar cómo la presencia e intensidad del patógeno está siendo afectada por variables geográficas y ambientales en esta región.

En esta investigación evaluamos la presencia de *Bd*, *Rv* y *Pr*, en ranas de desarrollo directo del género *Pristimantis* en 17 localidades ubicadas en las provincias de Azuay y Cañar en el Sur del Ecuador. Comparamos la prevalencia e intensidad de infección de cada enfermedad entre especies y a través de variables biogeográficas (localidad, elevación) y ambientales (ecosistema).

Debido a la amplia distribución de *Bd* y *Rv*, así como registros previos de *Bd* en el país y particularmente en regiones altoandinas, esperamos encontrar presencia de estos patógenos en nuestra área de estudio. Sin embargo, dada la escasez de casos de mortalidad reportados en Ecuador atribuidos a estas enfermedades, predecimos una baja prevalencia e intensidad de infección. La presencia de *Pr* en el sur de América ha sido reportada únicamente en Guayana francesa (Chambouvet et al., 2015), por lo que uno de nuestros objetivos es evaluar la presencia de este patógeno en el Ecuador.

CAPÍTULO 1: METODOLOGÍA

1.1 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en 17 localidades ubicadas en las provincias de Azuay y Cañar al Sur de los Andes de Ecuador. Las localidades muestreadas incluyeron Angas, Ishcayrumi, Napale, Duglaiy, Bermejós, Chacayacu, Durazos, Galgal, Miguir, Quimsacocha, Cabogana, Jima, Labrados, Llavircay, Llaviucu, Merced, Pugiloma (**Figura 1, Tabla 1**). Las coordenadas, elevación y tipo de ecosistema de cada localidad están detalladas en la **Tabla 1**. Las localidades de estudio abarcan un gradiente altitudinal desde los 2830 hasta los 3951 msnm, un rango de temperatura media anual entre 2-14°C y un rango de precipitación media anual entre 500-1500 mm (SIGAGRO, 2002b, 2002a).

Nuestras localidades de muestreo incluyeron cuatro tipos de ecosistemas:

Herbazal del Páramo, Bosque Siempreverde Montano Alto de Cordillera Occidental de los Andes, Bosque Siempreverde Montano de Cordillera Occidental de los Andes y Bosque Siempreverde Montano Alto del Sur de la Cordillera Oriental de los Andes. 12 de las 17 localidades en el estudio corresponden a Herbazal del Páramo, el cual representa el ecosistema más extenso dentro de las zonas montañosas del país (MAE, 2013). Tres localidades

corresponden a Bosque Siempreverde Montano Alto de Cordillera Occidental de los Andes, un ecosistema que se encuentra distribuido en forma de parches cercano a quebradas o áreas con pendientes pronunciadas, con un sotobosque denso con abundancia de especies herbáceas, epífitas y briófitas (MAE, 2013) y que cuenta con un dosel entre 15-20 m de altura (Josse et al., 2003). Una única localidad corresponde a Bosque Siempreverde Montano de Cordillera Occidental de los Andes, dónde se puede observar los árboles cubiertos de briófitas (MAE, 2013) y el dosel en este ecosistema alcanza los 25 m de altura (Valencia et al., 1999). Por último, una localidad corresponde a Bosque Siempreverde Montano Alto del Sur de la Cordillera Oriental de los Andes, este ecosistema se distribuye en parches cerca de quebradas o laderas montañosas bastante empinadas y tiene un dosel entre 8 y 10 m de alto con abundantes especies epífitas y briófitas (MAE, 2013).

Tabla 1. Coordenadas, elevación y tipo de ecosistema perteneciente a cada localidad en nuestra área de estudio.

Coord. X	Coord. Y	Localidad	Elevación (m.s.n.m.)	Ecosistema
693237	9679116	Angas	3233	Bosque siempreverde montano alto de Cordillera Occidental de los Andes
696549	9664905	Bermejós	3765	Herbazal del Páramo
714981	9685016	Cabogana	3023	Bosque siempreverde montano de Cordillera Occidental de los Andes
678711	9687508	Chacayacu	3789	Herbazal del Páramo
688863	9682281	Duglaiy	3872	Herbazal del Páramo
704151	9659163	Duraznos	3379	Bosque siempreverde montano alto de Cordillera Occidental de los Andes
691729	9673158	Galgal	3707	Herbazal del Páramo
693237	9679116	Ishcayrrumi	3796	Herbazal del Páramo
720252	9644848	Jima	3300	Herbazal del Páramo
717860	9697858	Labrados	3414	Herbazal del Páramo
720353	9713363	Llavircay	2830	Herbazal del Páramo
704364	9685560	Llaviucu	3228	Bosque siempreverde montano alto de Cordillera Occidental de los Andes
737129	9670045	Merced	3100	Bosque siempreverde montano alto del Sur de la Cordillera Oriental de los Andes
694412	9690599	Miguir	3852	Herbazal del Páramo
689997	9679823	Napale	3951	Herbazal del Páramo
746140	9707270	Pugiloma	3100	Herbazal del Páramo
698753	9663671	Quimsacocha	3768	Herbazal del Páramo

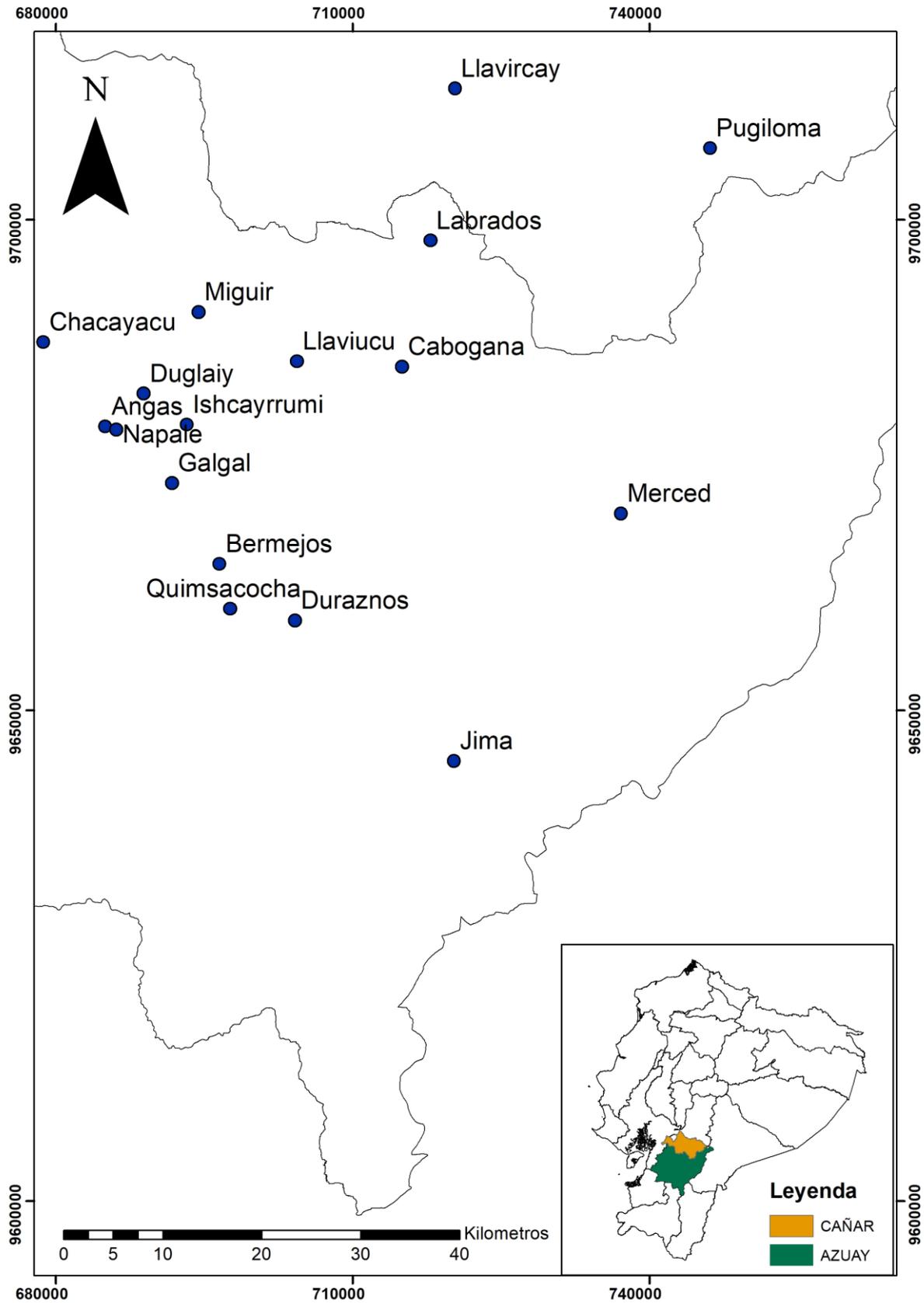


Figura 1. Ubicación de las 17 localidades de muestreo de ranas del género *Pristimantis* (círculo azul), en las provincias de Azuay y Cañar, sur de los Andes de Ecuador. Fuente: Cartografía del IERSE, UDA.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Recolección de datos

Las muestras fueron colectadas entre mayo y agosto del 2018 en 17 localidades de la zona altoandina del sur de los Andes de Ecuador. Colectamos especímenes de ranas terrestres del género *Pristimantis* en cada localidad entre las 19:00 y 23:00 horas. Antes y después de cada muestreo seguimos un protocolo de desinfección según lo establecen Aguirre & Lampo (2006), rociando las botas de campo con agua clorada; con el fin de evitar una posible contaminación y dispersión de patógenos. Cada individuo fue colectado con guantes desechables (uno por individuo) y depositado en una funda plástica transparente contenidas de aire y una servilleta húmeda. Los individuos colectados fueron trasladados a una estación temporal de campo, donde se obtuvieron muestras de swabs (frotos): 5 en el vientre, 5 en el dorso, 5 en cada muslo, 5 en cada pie y 5 en cada mano. El examen de swabs de piel puede realizarse con muestras frescas, congeladas o fijadas (Berger et al., 2009; Karwacki et al., 2018). Los swabs fueron colocados inmediatamente en tubos de muestras con etanol al 90% y depositadas en un congelador a -20°C.

1.2.2 Análisis de laboratorio

El ADN de cada swab fue extraído usando el kit de extracción Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante para obtener una elusión del 200 µL que fue almacenada en un congelador a -20°C. La concentración de ADN (ng/µL) en cada muestra, fue cuantificada usando un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific). Como criterio de pureza se consideraron las relaciones de A260:280 y A260:230. Esta cuantificación de ADN permite evidenciar que la ausencia de patógenos en una determinada muestra es en efecto un verdadero negativo y no un artefacto de la ausencia o baja calidad de ADN en la muestra. Cada muestra fue analizada usando pruebas qPCR para determinar la presencia/ausencia de *Bd*, *Rv* y *Pr* y para cuantificar la carga patogénica. La qPCR es una técnica mucho más sensible que la PCR convencional, utiliza una sonda de oligonucleótidos etiquetado con un reportero fluorescente que permiten detectar cantidades mínimas de ácido nucleico presentes en una muestra y cuantifica la cantidad de ADN comparándolo con estándares de concentración conocidos (Bustin & Vandesompele, 2009). Como la qPCR puede detectar cantidades extremadamente pequeñas de ADN patógeno, se puede usar para confirmar infección en swabs de piel, eliminando la necesidad de un muestreo destructivo (Karwacki et al., 2018).

Específicamente se usó los estándares, primers y protocolos detallados en Boyle et al. (2004) y Karwacki et al. (2018) (ver **Anexo 7**). Se utilizó una reacción total de 25 µL que incluyó 8 µL de Supermix (Bio-Rad), 2 µL de cada primer forward y reverse (10 µM), 5 µL de sonda (1 µM; ver **Anexo 7**), 5 µL de agua grado molecular y 5 µL de ADN. La preparación de las reacciones fue realizada en un cuarto ultra limpio. Los análisis fueron realizados en un termociclador Bio-Rad CFX96 Real-Time System y analizados usando Bio-Rad CFX Manager software. Las diluciones estándares de cada gBlock (fragmentos de un gen específicos verificados mediante

secuenciación para *Bd*, *Pr*, *Rv*) para cada patógeno fueron triplicadas en cada análisis. La dilución más alta para *Bd* fue 2×10^7 copias de gen/reacción y la más baja fue 2×10^0 ; para *Pr* la dilución más alta fue 2×10^9 copias de gen/reacción y la más baja fue 2×10^2 ; finalmente para *Rv* la dilución más alta fue 2×10^8 copias de gen/reacción y la más baja fue 2×10^0 . En adición, cada análisis incluyó dos controles negativos para asegurar que no existió contaminación durante la preparación de las reacciones. No encontramos contaminación en ninguna de las reacciones.

Las condiciones de qPCR fueron las siguientes: 95°C por 5:00m, seguido de 40 ciclos de 95°C por 0:15s y 60°C (para *Bd* y *Rv*) y 59°C (para *Pr*) por 1:00m. Inicialmente analizamos la ausencia/presencia de patógenos agrupando muestras por cada localidad. Para este fin usamos una mezcla de 5 μ L de ADN de cada individuo por localidad y determinamos la presencia de *Bd*, *Rv* y *Pr*. Realizamos este procedimiento tres veces. Cuando obtuvimos resultados positivos en dos de las tres amplificaciones repetimos el mismo procedimiento, pero esta vez analizando cada muestra individualmente. Nuevamente repetimos el proceso con las muestras individuales tres veces y usamos el valor obtenido en cada amplificación para obtener un promedio final de la intensidad de infección. Las muestras fueron consideradas positivas para *Bd*, *Rv* y *Pr* cuando se amplificaron antes de 38 ciclos al menos en dos análisis independientes. Para asegurar que los análisis que realizamos fueron patógeno-específicos, amplificamos las muestras positivas con PCR, usando los primers detallados en el **Anexo 7** (Boyle et al. 2004; Karwacki et al. 2018). Los productos fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa 2%. Los productos fueron secuenciados en Eurofins Genomics (Louisville, Kentucky, USA). Usamos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en Geneious 10 (BioMatters) para comparar nuestras secuencias con otras secuencias similares en GenBank.

1.2.3 Identificación de especies

Dado que el género *Pristimantis* es taxonómicamente complejo tomamos diversas estrategias para identificar los individuos utilizados en nuestro estudio. Primero, en base a similitudes morfológicas detalladas en Hedges et al. (2008), Lynch & Duellman (1997), Páez & Ron (2019) y Urgiles et al. (2019) separamos a nuestros individuos en cinco grupos taxonómicos: *Pristimantis cryophilus*, *Pristimantis lacrimosus*, *Pristimantis orestes*, *Pristimantis phoxocephalus* y *Pristimantis unistrigatus*. Después realizamos comparaciones en base a características morfológicas y distribuciones geográficas con descripciones originales y fotografías de material tipo de especies de *Pristimantis* del Sur del Ecuador (Ron et al., 2018). Aquellos individuos que no pudimos identificar o que no están formalmente descritos se mantuvieron como sp (especie indeterminada) y se agruparon de acuerdo a las localidades donde fueron encontradas.

1.2.4 Análisis de datos

Los análisis estadísticos se efectuaron en la consola del software R (R Core Team, 2019) utilizando los paquetes ggplot2, gridExtra, DescTools, PropCIs, psych (Revelle, 2019; Scherer, 2018; Signorell et mult. al., 2020; Wickham, 2016). Se realizaron en base a la prevalencia

(proporción entre el número de infectados para el total de individuos) y la intensidad de infección (promedio de equivalentes genómicos (EG) detectados en un individuo). Utilizamos test chi cuadrado para comparar la prevalencia e intensidad de infección por *Bd*, *Rv* y *Pr* entre localidad, elevación, ecosistema y especie. Utilizamos intervalos de confianza binomiales Clopper-Pearson para evaluar la incertidumbre en la estimación de la prevalencia observada.

CAPÍTULO 2: RESULTADOS

Obtuvimos swabs de 213 individuos. Un total de 10 individuos se encontraron infectados por *Bd* (5%; intensidad de infección promedio = 1.77×10^6 EG), 3 infectados por *Rv* (1%; intensidad de infección promedio = 11930 EG), y 6 infectados por *Pr* (3%; intensidad de infección promedio = 104 EG) (**Tabla 2, Tabla 4**). Los individuos infectados corresponden a tres grupos taxonómicos o complejo de especies: *Pristimantis cryophilus* (*Bd*), *Pristimantis orestes* (*Bd*; *Rv*; *Pr*) y *Pristimantis phoxocephalus* (*Bd*; *Rv*).

2.1 Prevalencia de infección

Detectamos infección por *Bd* en tres localidades: Bermejitos (12% de prevalencia, con una intensidad promedio de 3331312 EG); Duglaly (25% de prevalencia, con una intensidad promedio de 34178 EG); y Labrados (16% de prevalencia, con una intensidad promedio de 1954723 EG) (**Fig. 2, Tabla 2, Tabla 4**). La prevalencia de *Bd* muestra diferencias significativas para localidad ($\chi^2 = 26.44$; $df = 16$; $p = 0.0481$); pero no para los otros factores considerados (elevación, ecosistema y especie) (**Tabla 3**). La infección por *Rv* se detectó únicamente para la localidad Labrados (10% de prevalencia, con una intensidad promedio de 11930 EG) (**Fig. 2, Tabla 2, Tabla 4**). La prevalencia de *Rv* no muestra diferencias significativas para ninguno de los factores considerados (localidad, elevación, ecosistema y especie) (**Tabla 3**). La infección por *Pr* se detectó para las localidades Angas (4% de prevalencia, con una intensidad promedio de 47 EG); Ishcayrumi (8% de prevalencia, con una intensidad promedio de 212 EG) y Napale (23% de prevalencia, con una intensidad promedio de 54 EG) (**Fig. 2, Tabla 2, Tabla 4**). La prevalencia de *Pr* muestra diferencias significativas para elevación ($\chi^2 = 31.54$; $df = 18$; $p = 0.0249$) y para localidad ($\chi^2 = 26.79$; $df = 16$; $p = 0.0439$); pero no para los otros factores considerados (ecosistema y especie) (**Tabla 3**).

Tabla 2. Número de individuos infectados por *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), *Ranavirus* (*Rv*) y *Perkinsea* (*Pr*). En paréntesis la prevalencia de infección (número de individuos infectados por localidad / tamaño de muestra).

Localidad	Elevación	Individuos	<i>Bd</i>	<i>Rv</i>	<i>Pr</i>
Napale	3951	13	-	-	3 (0.23)
Duglaiy	3872	8	2 (0.25)	-	-
Miguir	3852	4	-	-	-
Ishcayrrumi	3796	24	-	-	2 (0.08)
Chacayacu	3789	1	-	-	-
Quimsacocha	3768	7	-	-	-
Bermejos	3765	26	3 (0.12)	-	-
Galgal	3707	3	-	-	-
Labrados	3414	31	5 (0.16)	3 (0.10)	-
Duraznos	3379	4	-	-	-
Jima	3300	18	-	-	-
Angas	3233	23	-	-	1 (0.04)
Llaviucu	3228	12	-	-	-
Merced	3100	10	-	-	-
Pugiloma	3100	1	-	-	-
Cabogana	3023	16	-	-	-
Llavircay	2830	12	-	-	-
TOTAL		213	10 (0.05)	3 (0.01)	6 (0.03)

Tabla 3. Valores del test chi-square para prevalencia de infección.

PREVALENCIA									
Variable	<i>Bd</i>			<i>Rv</i>			<i>Pr</i>		
	X ²	df	p-value	X ²	df	p-value	X ²	df	p-value
Localidad	26.44	16	*0.0481	17.87	16	0.3319	26.79	16	*0.0439
Elevación	26.44	18	0.0901	17.87	18	0.4646	31.54	18	*0.0249
Ecosistema	4.61	3	0.2028	1.34	3	0.7205	0.93	3	0.8174
Especie	16.54	20	0.6829	5.62	20	0.9993	15.14	20	0.7687

*estadísticamente significativo

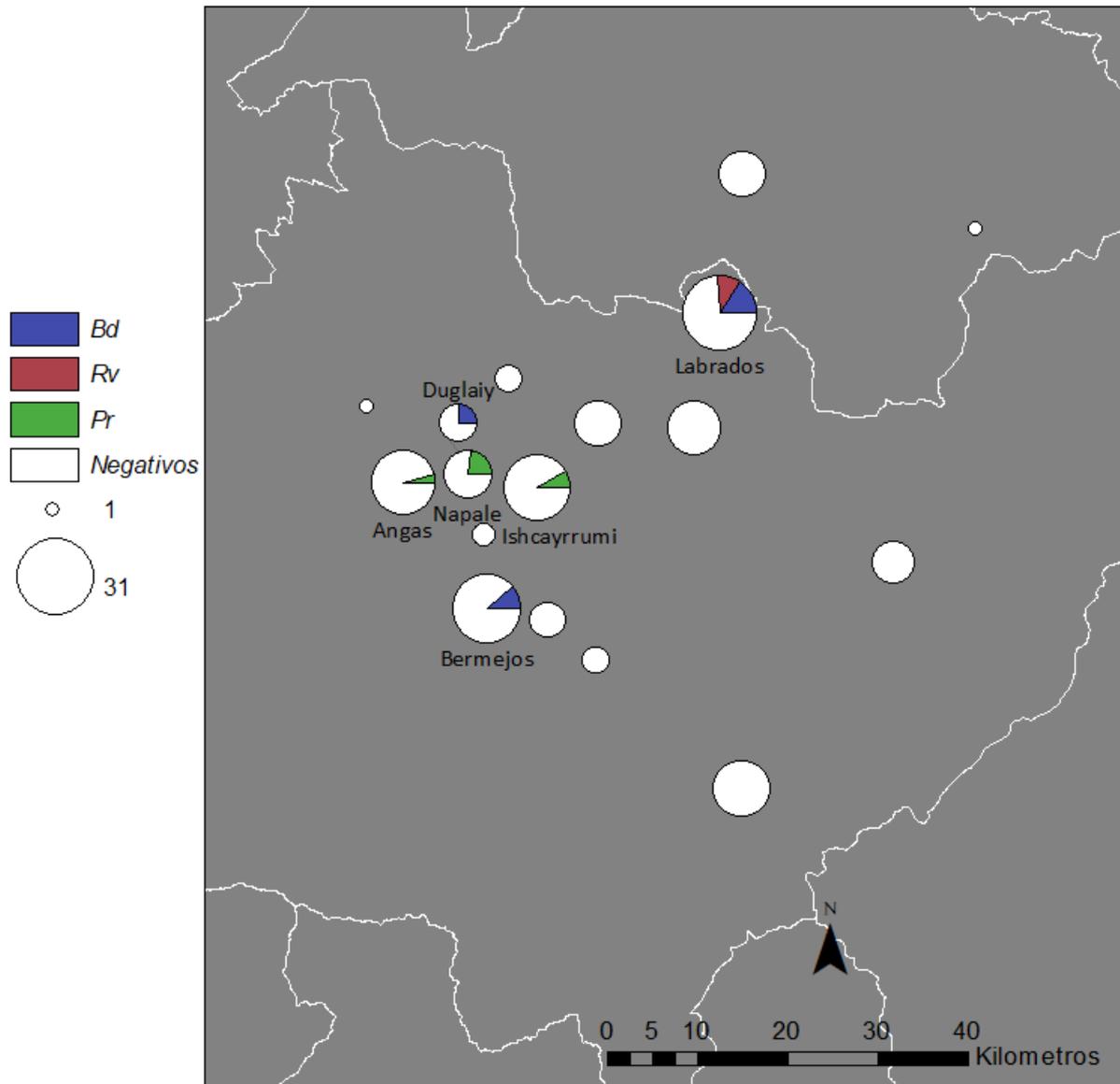


Figura 2. Prevalencia de patógenos por localidades. En azul individuos infectados por *Bd*; en rojo individuos infectados por *Rv*; en verde individuos infectados por *Pr*; en blanco aquellos no infectados. El tamaño del círculo es proporcional al tamaño de muestra.

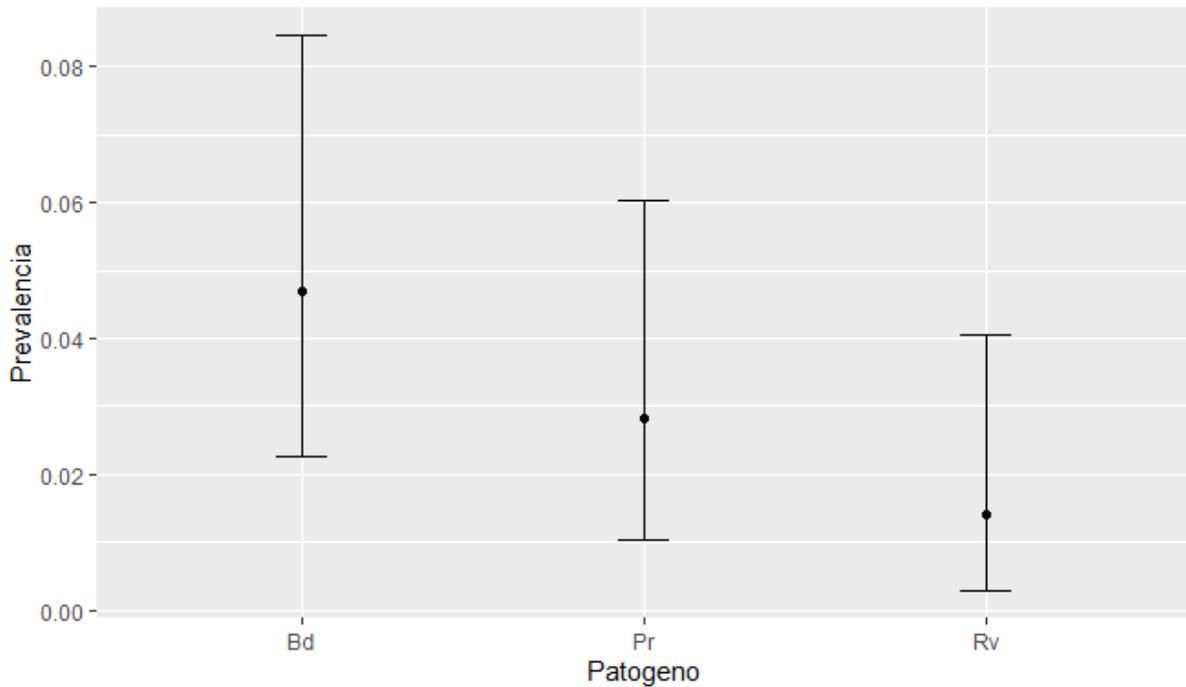


Figura 3. Intervalos de confianza Clopper-Pearson para la prevalencia observada.

2.2 Intensidad de infección

Los promedios más altos de intensidad de infección fueron registrados para *Bd*, seguido por *Rv* y *Pr* (**Tabla 4**). Para ninguna de las enfermedades encontramos diferencias significativas en la intensidad de infección entre elevación y localidad (**Fig. 4: B, D, F**), ni para los otros factores considerados (**Tabla 5**).

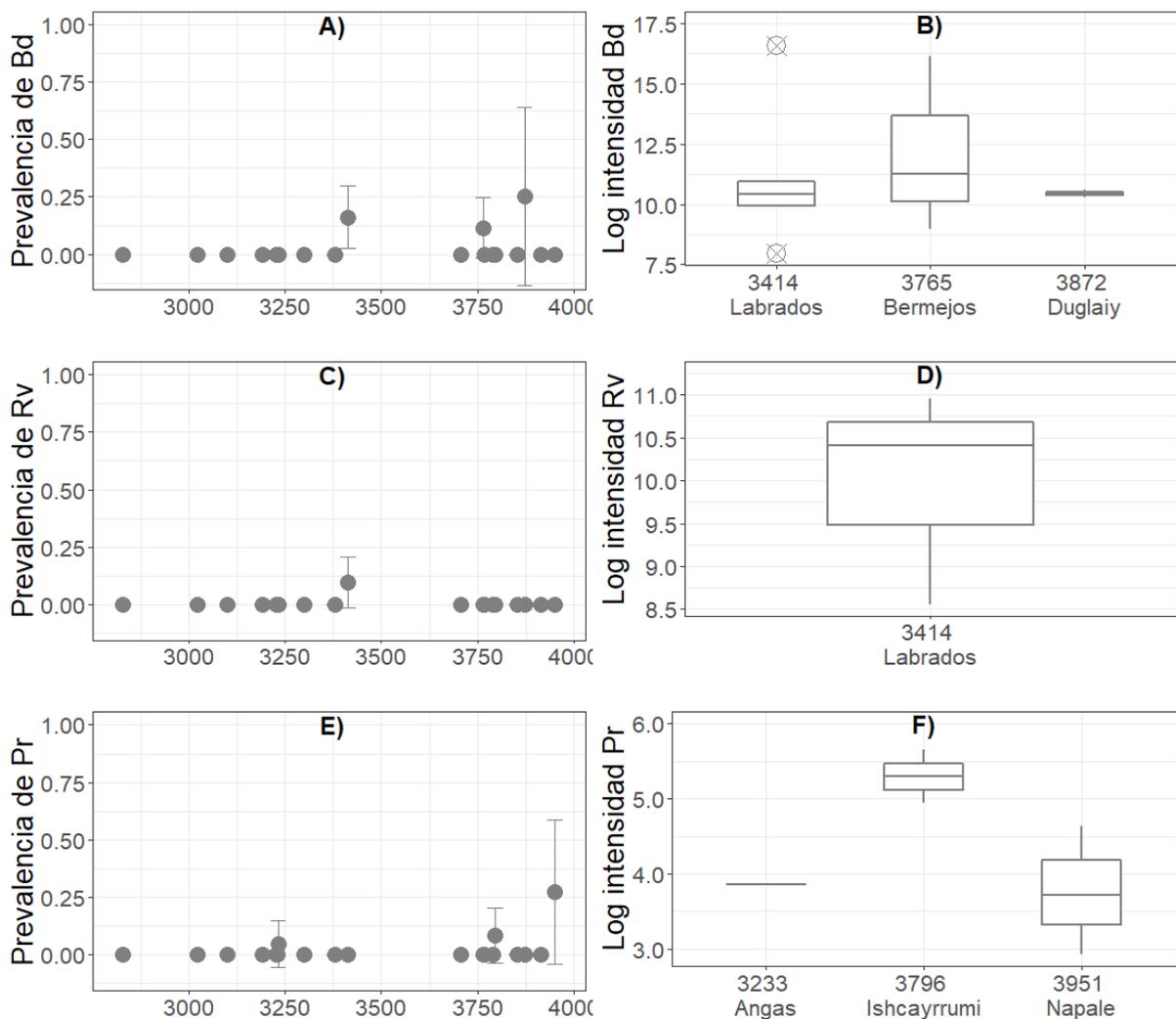
Tabla 4. Promedio de intensidad de infección en número de Equivalentes Genómicos (EG), en base a los positivos, para *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), *Ranavirus* (*Rv*) y *Perkinsea* (*Pr*); agrupada por localidad.

Localidad	Elevación	<i>Bd</i>	<i>Rv</i>	<i>Pr</i>
Napale	3951			54.42
Duglaiy	3872	34178.27		
Ishcayrumi	3796			212.01
Bermejos	3765	3331312.06		
Labrados	3414	1954723.28	11930.68	
Angas	3233			47.50

Tabla 5. Valores del test chi-square para intensidad de infección.

INTENSIDAD									
Variable	<i>Bd</i>			<i>Rv</i>			<i>Pr</i>		
	X ²	df	p-value	X ²	df	p-value	X ²	df	p-value
Localidad	20.00	18	0.3328	-un solo nivel-			12.00	10	0.2851
Elevación	20.00	18	0.3328	-un solo nivel-			12.00	10	0.2851
Ecosistema	-un solo nivel-			-un solo nivel-			6.00	5	0.3062
Especie	30.00	27	0.3142	3.00	2	0.2231	6.00	5	0.3062

*estadísticamente significativo

**Figura 4.** Prevalencia y logaritmo natural de la intensidad de infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Ranavirus* y *Perkinsea*, según elevación. **A)** Prevalencia de *Bd*; **B)** intensidad de *Bd*; **C)** prevalencia de *Rv*; **D)** intensidad de *Rv*; **E)** prevalencia de *Pr*; **F)** intensidad de *Pr*.

CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN

Identificamos brotes de infección de los tres patógenos investigados. Encontramos *Bd* en tres localidades (Bermejos, Duglaiy y Labrados), *Rv* en una localidad (Labrados) y *Pr* en tres localidades (Angas, Ishcayrrumi y Napale). Sin embargo, nuestros resultados evidenciaron una baja prevalencia de *Bd*, *Rv* y *Pr* en las especies y localidades examinadas. La intensidad de infección fue similar entre los individuos infectados para cada uno de los patógenos. Tres grupos taxonómicos o complejo de especies, *Pristimantis cryophilus*, *Pristimantis phoxocephalus* y *Pristimantis orestes* fueron afectados, lo que sugiere que los patógenos no son específicos. La intensidad de infección no fue significativamente relacionada con ninguna variable ambiental o geográfica.

3.1 Prevalencia e intensidad de infección por *Bd*

Encontramos diferencias significativas en la prevalencia de infección por *Bd* entre nuestras localidades de muestreo. Sin embargo, no encontramos ninguna diferencia en la intensidad de infección entre los otros factores analizados (**Tabla 3**). *Bd* fue más prevalente que *Pr* y *Rv* lo cual evidencia una mayor distribución de este patógeno. El análisis exploratorio de Cáceres-Andrade (2014) en la comunidad de anfibios del Parque Nacional Cajas (PNC), reportó la presencia de *Bd* en 12 de 14 localidades estudiadas, con valores de prevalencia entre 9% y 80% ($\bar{X} = 35\%$). Las localidades muestreadas que coinciden con las de nuestra investigación incluyen Angas, Ishcayrrumi y Llaviucu. Cáceres-Andrade (2014) reporta valores de prevalencia de *Bd* en ranas *Pristimantis* de 12% (1/8) para Angas, 0% (0/6) para Ishcayrrumi y 60% (3/5) para Llaviucu, sin embargo, nosotros no encontramos presencia de infección por *Bd* en ninguna de estas localidades. Esto puede deberse a diferencias en el tiempo de muestreo, ya que Cáceres-Andrade (2014) tomó muestras en junio/diciembre y nosotros en mayo/agosto. El muestreo en diferentes periodos podría sugerir un efecto de estacionalidad en las dinámicas de *Bd* que sería interesante evaluar a futuro. Además, los tamaños de muestra reportados en el estudio de Cáceres-Andrade (2014) son bajos por lo que sus intervalos de confianza son grandes.

Guayasamin et al. (2014) evaluaron la prevalencia e intensidad de infección por *Bd* en una comunidad de ranas en la Cordillera Occidental de los Andes de Ecuador. Su estudio reporta valores altos de prevalencia de *Bd* 40% (65/161) en ranas *Pristimantis*. En nuestro estudio únicamente registramos una prevalencia de 5% (10/213). Esto podría deberse a diferencias entre el número de localidades muestreadas, que en nuestro caso incluyó 17 localidades, mientras que el área de estudio de Guayasamin et al. (2014) corresponde a una sola localidad. Esta localidad presenta un rango de elevación entre 1825 y 2400 msnm, mientras que nuestro estudio fue realizado en localidades en un rango de elevación entre 2830 y 3951 msnm. Estudios previos enfocados en determinar los límites termales de *Bd*, sugieren que el hongo puede habitar en un amplio rango de temperaturas (4-25°C) (Piotrowski et al., 2004) pero su rango óptimo de crecimiento ocurre entre 17 y 25°C (Piotrowski et al., 2004). Las diferencias

encontradas en la prevalencia de *Bd* entre nuestro estudio y Guayasamin et al. (2014) pueden deberse a diferencias en las temperaturas medias entre las localidades de estudio ya que nuestros sitios de muestreo se encuentran en ecosistemas más elevados y por ende presentan temperaturas medias más bajas. En el caso de Guayasamin et al. (2014) el rango de temperatura oscila entre 11-15°C y en nuestro estudio entre 2-14°C. Es posible que las condiciones en las regiones más elevadas de los Andes de Ecuador puedan ser menos óptimas para el desarrollo de *Bd*, sin embargo, se requiere generar un análisis a una escala espacial y temporal más grande para determinar estos patrones.

El primer registro de *Bd* para el país tuvo lugar en 1980, en individuos de *Atelopus bomolochos* (Ron & Merino-Viteri, 2000). El territorio que ocupaba esta especie de sapo arlequín incluye las provincias de nuestra área de estudio (Azuay y Cañar) (Coloma et al., 2018), por lo que suponemos que *Bd* y la comunidad de anfibios de esta zona llevarían interactuando por cerca de cuatro décadas. Es probable que las especies de anfibios andinos en Ecuador que están presentes en la actualidad sean aquellas que han sobrevivido, debido a que poseen cierta tolerancia a *Bd* (Guayasamin et al., 2014). En otro estudio realizado en el bosque atlántico de Brasil, al evaluar experimentalmente cuatro especies de ranas con fase larvaria y una de desarrollo directo, se encontró que la especie de desarrollo directo *Brachycephalus pitanga* presentó mayores cargas de *Bd* y fue más propensa a sufrir eventos de mortalidad al convivir en terrarios bajo condiciones controladas con los anuros de reproducción acuática (Becker et al., 2019). Esto sugiere que no serían necesariamente tolerantes sino que no están muy expuestas a *Bd* precisamente por sus hábitos terrestres y porque al no presentar una etapa bifásica, individuos en etapas tempranas de desarrollo no están en contacto directo con cuerpos de agua.

Entre los mecanismos de persistencia de los hospedadores, se ha identificado algunas especies y géneros de bacterias que habitan la piel de anfibios y limitan la habilidad del hongo para colonizar y proliferar; algunas de estas bacterias se han encontrado también en Ecuador para ranas *Pristimantis* (Bresciano et al., 2015). A futuro, esperamos correlacionar nuestros resultados con estudios de bioma en la piel de ranas terrestres de desarrollo directo.

3.2 Prevalencia e intensidad de infección por *Pr*

Encontramos diferencias significativas en la prevalencia de infección por *Pr* entre nuestras localidades de muestreo y por elevación. Mientras que la intensidad de infección no presentó diferencias significativas para ninguno de los factores considerados (**Tabla 5**). Karwacki et al. (2018) al examinar tejidos y swabs evidenciaron que las infecciones por *Pr* variaron estacionalmente y se volvieron más severas en los meses más fríos del año. Esto parece concordar con nuestro estudio ya que encontramos diferencias significativas entre altitud para la prevalencia de *Pr*, estando presente en localidades altas y por tanto más frías (**Tabla 2**). Sin embargo, una de las limitaciones de nuestro muestreo es que no tenemos datos para comparar

entre temporadas, por lo que no podemos comprobar este patrón en base a nuestros resultados actuales.

Se debe tener claro que la presencia de material genético de *Pr* en los individuos no implica necesariamente que padezcan de SPI (infección severa de Perkinsea). Los estudios deben componerse de una examinación patológica completa, que incluye demostrar cambios patológicos a nivel de tejido, así como la identificación molecular en órganos internos perjudicados (Isidoro-Ayza et al., 2019). Estos dos requerimientos son necesarios para relacionar efectivamente la presencia del agente patógeno (infección), con afecciones lesivas (enfermedad) (A. Duffus, 2010; Scott, 1988). Nosotros vamos a realizar análisis histológicos en muestras de tejido de *Pristimantis* infectados con *Pr* en un estudio futuro.

Se conoce que los individuos adultos pueden contener eficientemente la infección por *Pr*, aislando los patógenos en granulomas (Jones et al., 2012). Este hecho es ratificado por Isidoro-Ayza et al. (2019) que en el monitoreo de 22 eventos de mortalidad, no encontraron ranas adultas con SPI. Siendo *Pristimantis* un género que no atraviesa por fase de renacuajo, no esperamos que las ranas con esta estrategia reproductiva (desarrollo directo) sean susceptibles a contraer SPI, sin embargo, es necesaria evidencia histológica que verifique esta hipótesis.

3.3 Prevalencia e intensidad de infección por *Rv*

La prevalencia e intensidad de infección por *Rv* no mostraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los factores considerados (**Tabla 4**). *Rv* no ha sido evaluada en el país; a pesar de ser la enfermedad con menor número de infecciones en nuestro estudio, se comprobó su presencia al sur del país para la localidad Labrados. Warne et al. (2016), de un total de 66 individuos de ranas *Pristimantis*, encontraron una prevalencia de infección por *Rv* de 37% en los Andes de Perú. Nosotros encontramos 1% de prevalencia en un tamaño de muestra de 213 individuos, esta diferencia puede deberse a los distintos métodos de detección, que en el caso de Warne et al. (2016) se realizó en base a hígados de las ranas. Se ha sugerido que para la detección de *Rv* las amplificaciones en base a tejidos internos son más confiables que los swabs de piel (Gray et al., 2009).

Se sabe que *Rv* afecta mayormente a renacuajos (antes y durante la metamorfosis) (Gray et al., 2009). La alta susceptibilidad de renacuajos a *Rv* y *Pr* probablemente se deba a la variación en la fisiología de larvas y adultos, exhibiendo las larvas una incapacidad de su sistema inmune para controlar la infección. El sistema inmune de renacuajos tiene un desarrollo incompleto, proporciona una defensa rápida pero inespecífica, tiene una débil respuesta adaptativa, depende de pocas clases de anticuerpos y en general se encuentra reducido en funciones (Pasquier, 1989; Robert & Ota, 2009). De esta manera se podría explicar la baja prevalencia encontrada en ranas *Pristimantis*, que no tienen una etapa de renacuajo. Sin embargo, es necesario generar estudios a una escala temporal más amplia para determinar potenciales variaciones en la prevalencia de *Rv*.

3.4 Intensidad de Infección

La intensidad de infección es una medida de susceptibilidad de los individuos a los patógenos; en el caso de *Bd*, Vredenburg et al. (2010) sugieren que valores superiores a 10000 EG de zoosporas conducen a la disminución de anfibios independientemente de la especie. En un estudio posterior realizado al sur de Brasil, Preuss et al. (2016) reportan una intensidad patogénica entre 4-156000 EG de zoosporas. No obstante, a pesar de las altas cargas no se registró signos clínicos ni mortalidad por *Bd*. Nuestros resultados para *Bd* muestran un promedio de intensidad de infección de 1773404 EG de zoosporas, esta carga patogénica es mayor a los valores reportados por Guayasamin et al. (2014) y Rivera et al. (2019). Para *Rv* el promedio de infección obtenido fue mayor que lo informado por Rivera et al. (2019). En el caso de *Pr* observamos un promedio de intensidad de infección notablemente menor que el reportado por Karwacki et al. (2018). Sin embargo, es importante recalcar que los valores absolutos de intensidad reportados en los estudios de Preuss et al. (2016), Vredenburg et al. (2010) y Guayasamin et al. (2014) y nuestra investigación podrían no ser necesariamente comparables debido a diferencias metodológicas en la detección de patógenos.

La baja prevalencia y alta intensidad observada en infecciones por *Bd* puede relacionarse con la tendencia documentada por Preuss et al. (2016), donde la intensidad de infección incrementa la prevalencia hasta un umbral en donde la relación se invierte debido a la mortalidad.

3.5 Coinfección

No encontramos individuos infectados con más de uno de los patógenos examinados, sin embargo, en Labrados existe simpatria de *Bd* y *Rv*. Dada la baja presencia de individuos infectados no podemos hacer generalizaciones al respecto de patrones de coinfección. No obstante, las dinámicas de coinfección son un componente clave para analizar a futuro, debido a la posibilidad de interacciones facilitativas o antagonistas entre distintos patógenos (Graham, 2008). A pesar de la reducida escala espacial y temporal de nuestra investigación, nuestros resultados resaltan la importancia de analizar en conjunto *Bd*, *Pr* y *Rv* en futuros trabajos de investigación a nivel local y regional.

3.6 Historia natural de ranas terrestres y su exposición a los patógenos

Es importante considerar que la historia natural de las especies hospederas puede ser un factor fundamental a considerar en cuanto a la exposición a patógenos, dependiendo del hábitat en uso y estrategia de reproducción (Becker et al., 2014). *Pristimantis* tiene una estrategia de desarrollo directo, no depende de cuerpos de agua para su reproducción, por lo que el uso reducido de dichos espacios disminuiría la probabilidad de contacto con estos patógenos que se dispersan por medios acuáticos. Otro factor que podría favorecer a la reducción de contagio estaría relacionada a las limitadas distribuciones que presentan la mayoría de especies de *Pristimantis* (Ron et al., 2018). Sin embargo, en el caso de *Bd*, cuando efectivamente existe la infección las ranas terrestres pueden ser más vulnerables debido a que en sus fases iniciales se

encuentran menos expuestas al patógeno que aquellos que atraviesan por una fase larvaria en agua, lo que no permitiría una buena respuesta de resistencia al daño provocado (Mesquita et al., 2017).

3.7 Consideraciones finales

Los brotes de infección se reportaron para Angas, Bermejós, Duglay, Napale, Ishcayrrumi y Labrados. En cinco de estos seis sitios la cobertura vegetal corresponde a Herbazal del Páramo (MAE, 2013). Asimismo, los grupos taxonómicos o complejo de especies infectadas incluyen *Pristimantis orestes*, *Pristimantis phoxocephalus* y *Pristimantis cryophilus*. Estas especies son habitantes comunes en páramo del sur de Ecuador, tienen actividad nocturna y se sabe que viven en simpatria (Frenkel et al., 2018; Frenkel, Páez-Rosales, et al., 2019; Frenkel, Varela-Jaramillo, et al., 2019). Otros géneros de anuros como *Atelopus*, *Telmatobius* y *Gastrotheca* también coexisten en este tipo de ecosistema y han sufrido descensos poblacionales importantes (Ron & Merino-Viteri, 2000). En este contexto, sería interesante evaluar la presencia de estos tres patógenos en especies de anuros altoandinos ya que el Herbazal de Páramo podría ser un ecosistema particularmente susceptible. Estudios posteriores nos ayudarán a esclarecer el panorama.

Finalmente y debido a que nuestro número de positivos es reducido (10 para *Bd*, 3 para *Rv*, 6 para *Pr*), nuestros resultados pueden ser limitados al momento de explicar patrones de infección, como lo manifiestan nuestros amplios intervalos de confianza (**Figura 3**). Sin embargo, es importante recalcar que incluso con estas limitaciones estamos encontrando presencia de infecciones patogénicas en una región ecológicamente diversa y pobremente estudiada. Es necesaria una mayor cantidad de muestras y una escala temporal más amplia para determinar qué variables están favoreciendo la prevalencia de estas enfermedades.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Reportamos el primer caso de *Ranavirus* y *Perkinsea* en anfibios para el país.
- Los efectos letales de infección por *Ranavirus* y *Perkinsea* solo se han reportado en renacuajos. Por esta razón, es preciso evaluar también otras especies de anfibios que puedan ser más sensibles a estos dos agentes infecciosos, como sapos (ej. *Atelopus*) y ranas que atraviesan metamorfosis (ej. *Gastrotheca*).
- Hay localidades y puntos específicos que podrían ser focos de infección por *Ranavirus* y *Perkinsea*, de ser el caso, esta sería una oportunidad para estudiar las dinámicas de su propagación.
- Estudios posteriores en *Perkinsea* deberían incluir examinación de tejidos.
- Con un mayor número de positivos sería conveniente realizar modelos lineales en base a variables climáticas.
- Al momento de realizar estudios en el campo es recomendable la aplicación de protocolos de desinfección para evitar la propagación de agentes infecciosos.
- Estudios posteriores en Ecuador deberían estandarizar metodologías, analizar vía qPCR y evaluar simultáneamente swabs bucales-corporales (número estándar de frotos) preferentemente en distintas estaciones a lo largo de año.

REFERENCIAS

- Aguirre, A. A., & Lampo, M. (2006). *Protocolo de bioseguridad y cuarentena para prevenir la transmisión de enfermedades en anfibios* (pp. 73–92).
- Alroy, J. (2015). Current extinction rates of reptiles and amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*, 201508681. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508681112>
- Becker, C. G., Bletz, M. C., Greenspan, S. E., Rodriguez, D., Lambertini, C., Jenkinson, T. S., Guimarães, P. R., Assis, A. P. A., Geffers, R., Jarek, M., Toledo, L. F., Vences, M., & Haddad, C. F. B. (2019). Low-load pathogen spillover predicts shifts in skin microbiome and survival of a terrestrial-breeding amphibian. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *286*(1908), 20191114. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1114>
- Becker, C. G., Rodriguez, D., Toledo, L. F., Longo, A., Lambertini, C., Corrêa, D., Leite, D., Haddad, C., & Zamudio, K. (2014). Partitioning the net effect of host diversity on an emerging amphibian pathogen. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *281*. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1796>
- Berger, L., Longcore, J., Speare, R., Hyatt, A., & Skerratt, L. (2009). Fungal Diseases in Amphibians. En *Amphibian Biology, Vol 8. Amphibian Decline: Disease, Parasites, Maladies, and Pollution* (Vol. 8, pp. 2986–3052).
- Berger, L., Speare, R., Daszak, P., Green, D. E., Cunningham, A. A., Goggin, C. L., Slocombe, R., Ragan, M. A., Hyatt, A. D., McDonald, K. R., Hines, H. B., Lips, K. R., Marantelli, G., & Parkes, H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(15), 9031. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9031>
- Blaustein, A. R., Urbina, J., Snyder, P. W., Reynolds, E., Dang, T., Hoverman, J. T., Han, B.,

- Olson, D. H., Searle, C., & Hambalek, N. M. (2018). Effects of Emerging Infectious Diseases on Amphibians: A Review of Experimental Studies. *Diversity*, *10*(3), 81. <https://doi.org/10.3390/d10030081>
- Bollinger, T. K., Mao, J., Schock, D., Brigham, R. M., & Chinchar, V. G. (1999). Pathology, isolation, and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. *Journal of Wildlife Diseases*, *35*(3), 413–429. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-35.3.413>
- Boyle, D., Boyle, D., Olsen, V., Morgan, J., & Hyatt, A. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of aquatic organisms*, *60*, 141–148. <https://doi.org/10.3354/dao060141>
- Brannelly, L. A., Webb, R. J., Hunter, D. A., Clemann, N., Howard, K., Skerratt, L. F., Berger, L., & Scheele, B. C. (2018). Non-declining amphibians can be important reservoir hosts for amphibian chytrid fungus. *Animal Conservation*, *21*(2), 91–101. <https://doi.org/10.1111/acv.12380>
- Brenes, R., Gray, M. J., Waltzek, T. B., Wilkes, R. P., & Miller, D. L. (2014). Transmission of Ranavirus between Ectothermic Vertebrate Hosts. *PLOS ONE*, *9*(3), e92476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092476>
- Bresciano, J. C., Salvador, C. A., Paz-Y-Miño, C., Parody-Merino, A. M., Bosch, J., & Woodhams, D. C. (2015). Variation in the Presence of Anti-Batrachochytrium dendrobatidis Bacteria of Amphibians Across Life Stages and Elevations in Ecuador. *EcoHealth*, *12*(2), 310–319. <https://doi.org/10.1007/s10393-015-1010-y>

- Brunner, J. L., Schock, D. M., Davidson, E. W., & Collins, J. P. (2004). Intraspecific Reservoirs: Complex Life History and the Persistence of a Lethal Ranavirus. *Ecology*, *85*(2), 560–566. JSTOR.
- Bustin, S., & Vandesompele, J. (2009). Standardization of qPCR and RT-qPCR. *Genetic engineering & biotechnology news: GEN*, *29*.
- Byrne, A. Q., Vredenburg, V. T., Martel, A., Pasmans, F., Bell, R. C., Blackburn, D. C., Bletz, M. C., Bosch, J., Briggs, C. J., Brown, R. M., Catenazzi, A., Familiar López, M., Figueroa-Valenzuela, R., Ghose, S. L., Jaeger, J. R., Jani, A. J., Jirku, M., Knapp, R. A., Muñoz, A., ... Rosenblum, E. B. (2019). Cryptic diversity of a widespread global pathogen reveals expanded threats to amphibian conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(41), 20382. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908289116>
- Cáceres-Andrade, J. F. (2014). *Análisis Exploratorio de datos para desarrollar propuestas de conservación de la comunidad de Anfibios referentes al Batrachochytrium dendrobatidis en el Parque Nacional Cajas, Cuenca-Ecuador* [Universidad del Azuay]. <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/3702>
- Catenazzi, A., Lehr, E., Rodriguez, L., & Vredenburg, V. (2010). *Batrachochytrium dendrobatidis* and the Collapse of Anuran Species Richness and Abundance in the Upper Manu National Park, Southeastern Peru. *Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology*, *25*, 382–391. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2010.01604.x>
- Chambouvet, A., Gower, D. J., Jirků, M., Yabsley, M. J., Davis, A. K., Leonard, G., Maguire, F., Doherty-Bone, T. M., Bittencourt-Silva, G. B., Wilkinson, M., & Richards, T. A. (2015). Cryptic infection of a broad taxonomic and geographic diversity of tadpoles by *Perkinsea* protists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(34), E4743-4751. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500163112>

Chinchar, V., Essbauer, S., He, J., Hyatt, A., Miyazaki, T., Seligy, V., & Williams, T. (2005).

Iridoviridae. In: Fauguet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus taxonomy: 8th report of the international committee on the taxonomy of viruses*.

Elsevier/Academic Press, London.

Collins, J. (2003). Global Amphibian Declines: Sorting the Hypotheses. *Diversity and*

Distributions, 9, 89–98. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00012.x>

Coloma, L. A., Frenkel, C., Félix-Novoa, C., Quiguango-Ubillus, A., & Varela-Jaramillo, A. (2018).

Atelopus bomolochos En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). En *Anfibios del Ecuador. Version 2019.0*. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del

Ecuador.

<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Atelopus%20bomolochos>

Coloma, L. A., Lötters, S., & Salas, A. W. (2000). Taxonomy of the *Atelopus ignescens* Complex

(Anura: Bufonidae): Designation of a Neotype of *Atelopus ignescens* and Recognition of *Atelopus exiguus*. *Herpetologica*, 56(3), 303–324. JSTOR.

Daszak, P., Berger, L., Cunningham, A. A., Hyatt, A. D., Green, D. E., & Speare, R. (1999).

Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. *Emerging Infectious Diseases*, 5(6), 735–748. <https://doi.org/10.3201/eid0506.990601>

Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife—Threats to biodiversity and human health. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5452), 443–449. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>

Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distributions*, 9(2), 141–150.

<https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2003.00016.x>

Davis, A., Yabsley, M., Keel, M., & Maerz, J. (2007). Discovery of a Novel Alveolate Pathogen

- Affecting Southern Leopard Frogs in Georgia: Description of the Disease and Host Effects. *EcoHealth*, 4, 310–317. <https://doi.org/10.1007/s10393-007-0115-3>
- Driskell, E. A., Miller, D. L., Swist, S. L., & Gyimesi, Z. S. (2009). PCR detection of Ranavirus in adult anurans from the Louisville Zoological Garden. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 40(3), 559–563. <https://doi.org/10.1638/2008-0076.1>
- Duffus, A. (2010). Chytrid Blinders: What Other Disease Risks to Amphibians Are We Missing? *EcoHealth*, 6, 335–339. <https://doi.org/10.1007/s10393-009-0271-8>
- Duffus, A. L. J., Waltzek, T. B., Stöhr, A. C., Allender, M. C., Gotesman, M., Whittington, R. J., Hick, P., Hines, M. K., & Marschang, R. E. (2015). Distribution and Host Range of Ranaviruses. En M. J. Gray & V. G. Chinchir (Eds.), *Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates* (pp. 9–57). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13755-1_2
- Fellers, G., Green, D., Longcore, J., & Jr, R. (2001). Oral Chytridiomycosis in the Mountain Yellow-Legged Frog (*Rana muscosa*). *Copeia*, 2001, 945–953. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2001\)001\[0945:OCITMY\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2001)001[0945:OCITMY]2.0.CO;2)
- Fisher, M., & Garner, T. (2007). The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, 21, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.02.002>
- Frenkel, C., Guayasamín, J. M., Yáñez-Muñoz, M. H., Varela-Jaramillo, A., & Ron, S. R. (2018). *Pristimantis cryophilus* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). En *Anfibios del Ecuador. Version 2019.0*. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Pristimantis%20cryophilus>

- Frenkel, C., Páez-Rosales, N., Varela-Jaramillo, A., & Guayasamín, J. M. (2019). *Pristimantis orestes* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). En *Anfibios del Ecuador. Version 2019.0*. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Pristimantis%20orestes>
- Frenkel, C., Varela-Jaramillo, A., & Guayasamín, J. M. (2019). *Pristimantis phoxocephalus* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). En *Anfibios del Ecuador. Version 2019.0*. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Pristimantis%20cryophilus>
- Graham, A. L. (2008). Ecological rules governing helminth–microparasite coinfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2), 566–570.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0707221105>
- Grant, E. H. C., Miller, D. A. W., Schmidt, B. R., Adams, M. J., Amburgey, S. M., Chambert, T., Cruickshank, S. S., Fisher, R. N., Green, D. M., Hossack, B. R., Johnson, P. T. J., Joseph, M. B., Rittenhouse, T. A. G., Ryan, M. E., Waddle, J. H., Walls, S. C., Bailey, L. L., Fellers, G. M., Gorman, T. A., ... Muths, E. (2016). Quantitative evidence for the effects of multiple drivers on continental-scale amphibian declines. *Scientific Reports*, 6(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/srep25625>
- Gray, M. J., Miller, D. L., & Hoverman, J. T. (2009). Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87(3), 243–266.
<https://doi.org/10.3354/dao02138>
- Green, D., Converse, K., & Schrader, A. (2002). Epizootiology of Sixty-Four Amphibian Morbidity and Mortality Events in the USA, 1996-2001. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969, 323–339. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04400.x>
- Greer, A., & Collins, J. (2008). Habitat fragmentation as a result of biotic and abiotic factors

controls pathogen transmission throughout a host population. *The Journal of animal ecology*, 77, 364–369. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2007.01330.x>

Guayasamin, J., Mendoza-Henao, A., Longo, A., Zamudio, K., & Bonaccorso, E. (2014). High prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in an Andean frog community (Reserva Las Galarias, Ecuador). *Amphibian & reptile conservation*, 8, 33–44.

Hedges, S. B., Duellman, W. E., & Heinicke, M. P. (2008). New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): Molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*, 1737(1), 1–182. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1737.1.1>

Isidoro-Ayza, M., Grear, D. A., & Chambouvet, A. (2019). Pathology and Case Definition of Severe Perkinsea Infection of Frogs. *Veterinary Pathology*, 56(1), 133–142.

<https://doi.org/10.1177/0300985818798132>

Isidoro-Ayza, M., Lorch, J. M., Grear, D. A., Winzeler, M., Calhoun, D. L., & Barichivich, W. J. (2017). Pathogenic lineage of Perkinsea associated with mass mortality of frogs across the United States. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10456-1>

IUCN. (2020). En *The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2019-3*.

<https://www.iucnredlist.org>

Jancovich, J., Davidson, E., Parameswaran, N., Mao, J., Chinchar, V., Collins, J., & Jacobs, B.

(2005). Evidence for emergence of an amphibian iridoviral disease because of human-enhanced spread. *Molecular ecology*, 14, 213–224. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02387.x>

Johnson, P. T. J., Rohr, J. R., Hoverman, J. T., Kellermanns, E., Bowerman, J., & Lunde, K. B.

(2012). Living fast and dying of infection: Host life history drives interspecific variation in infection and disease risk. *Ecology Letters*, 15(3), 235–242.

<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01730.x>

Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, *451*(7181), 990–993.

<https://doi.org/10.1038/nature06536>

Jones, M., Armién, A., Rothermel, B., & Pessier, A. (2012). Granulomatous myositis associated with a novel alveolate pathogen in an adult Southern Leopard Frog (*Lithobates sphenocephalus*). *Diseases of aquatic organisms*, *102*, 163–167.

<https://doi.org/10.3354/dao02539>

Karwacki, E. E., Atkinson, M. S., Ossiboff, R. J., & Savage, A. E. (2018). Novel quantitative PCR assay specific for the emerging *Perkinsea* amphibian pathogen reveals seasonal infection dynamics. *Diseases of Aquatic Organisms*, *129*(2), 85–98.

<https://doi.org/10.3354/dao03239>

Kruger, K., Hines, H., Hyatt, A., Boyle, D., & Hero, J.-M. (2006). Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: Comparing histology with real-time Taqman PCR. *Diseases of aquatic organisms*, *71*, 141–148. <https://doi.org/10.3354/dao071141>

Kruger, K., Pereoglou, F., & Hero, J.-M. (2007). Latitudinal Variation in the Prevalence and Intensity of Chytrid (*Batrachochytrium dendrobatidis*) Infection in Eastern Australia. *Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology*, *21*, 1280–1290. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2007.00777.x>

Lynch, J. D., & Duellman, W. E. (1997). *Frogs of the Genus Eleutherodactylus (Leptodactylidae) in Western Ecuador: Systematic, Ecology, and Biogeography*. Natural History Museum, University of Kansas. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.7951>

Mccracken, S., Gaertner, J., Forstner, M., & Hahn, D. (2009). Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians from the forest floor to the upper canopy of an Ecuadorian

Amazon lowland rainforest. *Herpetological Review*, 40, 190–195.

Medina-Vogel, G. (2010). Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Archivos de medicina veterinaria*, 42(1), 11–24.

<https://doi.org/10.4067/S0301-732X2010000100003>

Mesquita, A. F. C., Lambertini, C., Lyra, M., Malagoli, L. R., James, T. Y., Toledo, L. F., Haddad, C. F. B., & Becker, C. G. (2017). Low resistance to chytridiomycosis in direct-developing amphibians. *Scientific Reports*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16425-y>

Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2013). *Sistema de Clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental* (R. Galeas, J. E. Guevara, B. Medina-Torres, M. Á. Chinchero, & X. Herrera, Eds.). Subsecretaría de Patrimonio Natural.

O’Hanlon, S., Rieux, A., Farrer, R., Rosa, G., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T., Murray, K., Brankovics, B., Fumagalli, M., Martin, M., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K., Berger, L., Böll, S., Brookes, L., Clare, F., Courtois, E., & Fisher, M. (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360, 621–627. <https://doi.org/10.1126/science.aar1965>

O’Rourke, K. H., & Williamson, J. G. (2002). When did globalisation begin? *European Review of Economic History*, 6(1), 23–50. <https://doi.org/10.1017/S1361491602000023>

Páez, N. B., & Ron, S. R. (2019). Systematics of *Huicundomantis*, a new subgenus of *Pristimantis* (Anura, Strabomantidae) with extraordinary cryptic diversity and eleven new species. *ZooKeys*, 868, 1–112. <https://doi.org/10.3897/zookeys.868.26766>

Pasquier, L. (1989). The Immune System Of *Xenopus*. *Annual Review of Immunology*, 7, 251–275. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.7.1.251>

Piotrowski, J. S., Annis, S. L., & Longcore, J. E. (2004). Physiology of *Batrachochytrium*

dendrobatidis, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, 96(1), 9–15.

Preuss, J., Lambertini, C., Leite, D., Toledo, L. F., & Lucas, E. (2016). Crossing the threshold: An amphibian assemblage highly infected with *Batrachochytrium dendrobatidis* in the southern Brazilian Atlantic forest. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 51, 1–10. <https://doi.org/10.1080/01650521.2016.1163857>

R Core Team. (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (Versión 3.6.2) [R]. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>

Retallick, R., Miera, V., Richards-Hrdlicka, K., Field, K., & Collins, J. (2006). A non-lethal technique for detecting the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* on tadpoles. *Diseases of aquatic organisms*, 72, 77–85. <https://doi.org/10.3354/dao072077>

Revelle, W. (2019). *psych: Procedures for Psychological, Psychometric, and Personality Research*. Northwestern University. <https://CRAN.R-project.org/package=psych>

Rivera, B., Cook, K., Andrews, K., Atkinson, M., & Savage, A. (2019). Pathogen Dynamics in an Invasive Frog Compared to Native Species. *EcoHealth*, 16. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01432-4>

Robert, J., Abramowitz, L., Gantress, J., & Morales, H. D. (2007). *Xenopus laevis*: A possible vector of Ranavirus infection? *Journal of Wildlife Diseases*, 43(4), 645–652. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-43.4.645>

Robert, J., & Ota, Y. (2009). Comparative and Developmental Study of the Immune System in *Xenopus*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 238, 1249–1270. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21891>

Rohr, J. R., & Raffel, T. R. (2010). Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(18), 8269.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0912883107>

Ron, S. R., & Merino-Viteri, A. (2000). Amphibian declines in Ecuador: Overview and first report of chytridiomycosis from South America. *FrogLog*, 42, 2–3.

Ron, S. R., Merino-Viteri, A., & Ortiz, D. A. (2018). En *Anfibios del Ecuador. Versión 2018.0*. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Scherer, R. (2018). *PropCIs: Various Confidence Interval Methods for Proportions*.

<https://CRAN.R-project.org/package=PropCIs>

Scott, M. E. (1988). The Impact of Infection and Disease on Animal Populations: Implications for Conservation Biology. *Conservation Biology*, 2(1), 40–56.

<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1988.tb00334.x>

Signorell, A. et mult. al. (2020). *DescTools: Tools for Descriptive Statistics*. <https://cran.r-project.org/package=DescTools>

Sistema de Información Geográfica del Agro. (2002a). *Mapa de Zonas de Precipitación del Ecuador Continental* [Map]. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.

<http://geoportal.agricultura.gob.ec/geonetwork/srv/spa/catalog.search#/metadata/e072046a-8a3d-4a73-875a-91001d5993d9>

Sistema de Información Geográfica del Agro. (2002b). *Mapa de Zonas de Temperatura del Ecuador Continental* [Map]. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.

<http://geoportal.agricultura.gob.ec/geonetwork/srv/spa/catalog.search#/metadata/736bacd6-fab4-4e9c-a388-1d03bd821288>

Skerratt, L., Berger, L., Speare, R., Cashins, S., McDonald, K., Phillott, A., Hines, H., & Kenyon, N. (2007). Spread of Chytridiomycosis Has Caused the Rapid Global Decline and Extinction of Frogs. *EcoHealth*, 4, 125–134. <https://doi.org/10.1007/s10393-007-0093-5>

Urgiles, V. L., Székely, P., Székely, D., Christodoulides, N., Sanchez-Nivicela, J. C., &

- Savage, A. E. (2019). Genetic delimitation of *Pristimantis orestes* (Lynch, 1979) and *P. saturninoi* Brito et al., 2017 and description of two new terrestrial frogs from the *Pristimantis orestes* species group (Anura, Strabomantidae). *ZooKeys*, 864, 111–146.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.864.35102>
- Valencia, R., Cerón, C., Palacios, W., & Sierra, R. (1999). Los sistemas de clasificación de la vegetación propuestos para el Ecuador. *Sierra, R.(ed). Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental. Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia, Quito*, 19–28.
- Varela-Jaramillo, A., Coloma, L. A., Frenkel, C., Félix-Novoa, C., & Quiguango-Ubillus, A. (2018). *Atelopus ignescens* En: Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. (Eds). En *Anfibios del Ecuador. Version 2019.0*. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
<https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Atelopus%20ignescens>
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R., & Skerratt, L. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of aquatic organisms*, 77, 113–118.
<https://doi.org/10.3354/dao01838>
- Vredenburg, V., Knapp, R., Tunstall, T., & Briggs, C. (2010). Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian population extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 9689–9694.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0914111107>
- Wake, D., & Vredenburg, V. (2008). Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 Suppl 1, 11466–11473.

<https://doi.org/10.1073/pnas.08019211105>

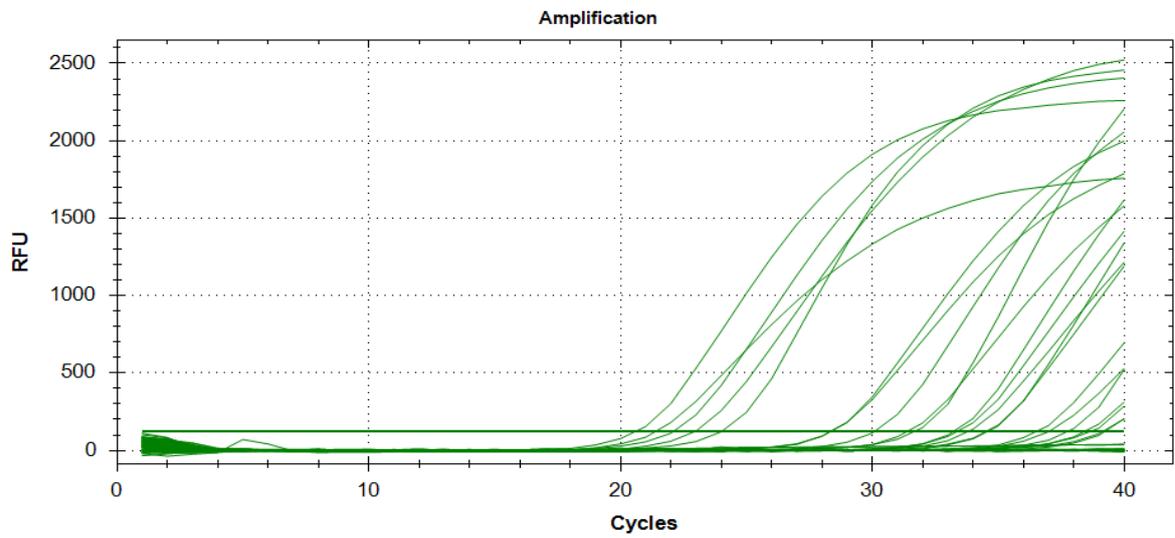
Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>

Warne, R. W., LaBumbard, B., LaGrange, S., Vredenburg, V. T., & Catenazzi, A. (2016). Co-Infection by Chytrid Fungus and Ranaviruses in Wild and Harvested Frogs in the Tropical Andes. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145864>

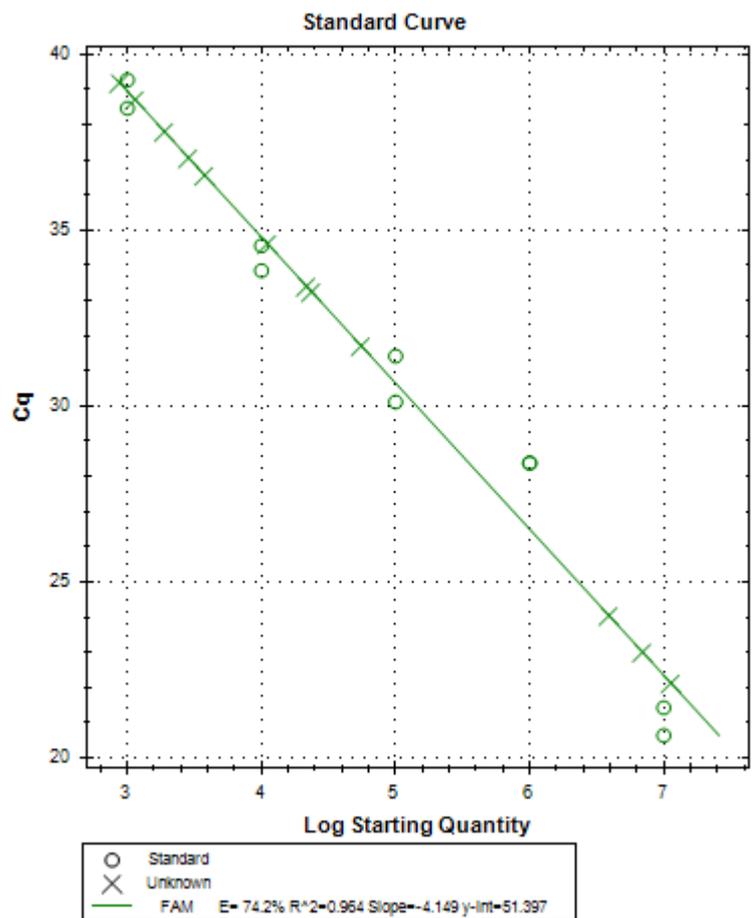
Williams, T., Barbosa Solomieu, V., & Chinchar, V. (2005). A Decade of Advances in Iridovirus Research. *Advances in virus research*, 65, 173–248. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(05\)65006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(05)65006-3)

ANEXOS

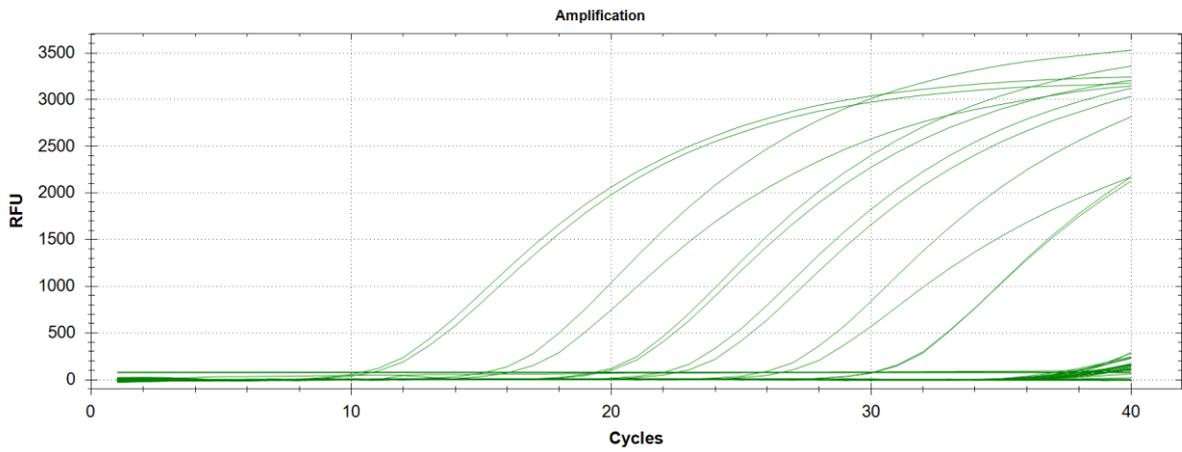
Anexo 1. Curva estándar de concentraciones conocidas (qPCR) de *Bd*.



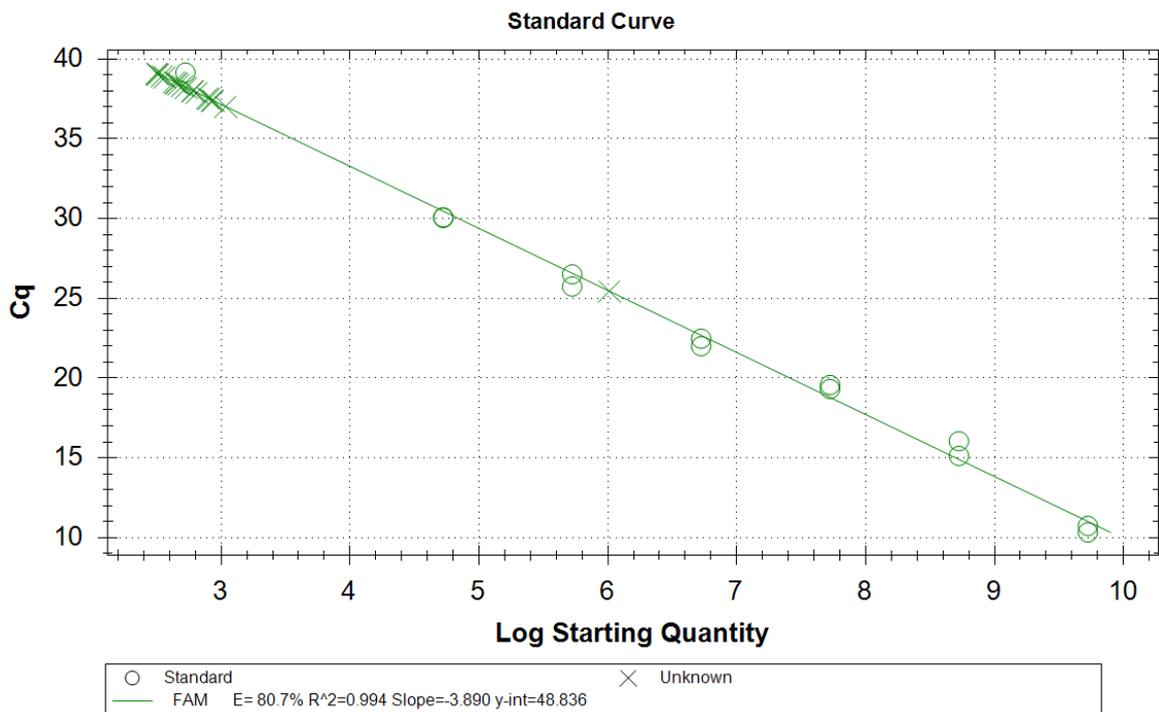
Anexo 2. Ajuste en base a la curva estándar de *Bd*.



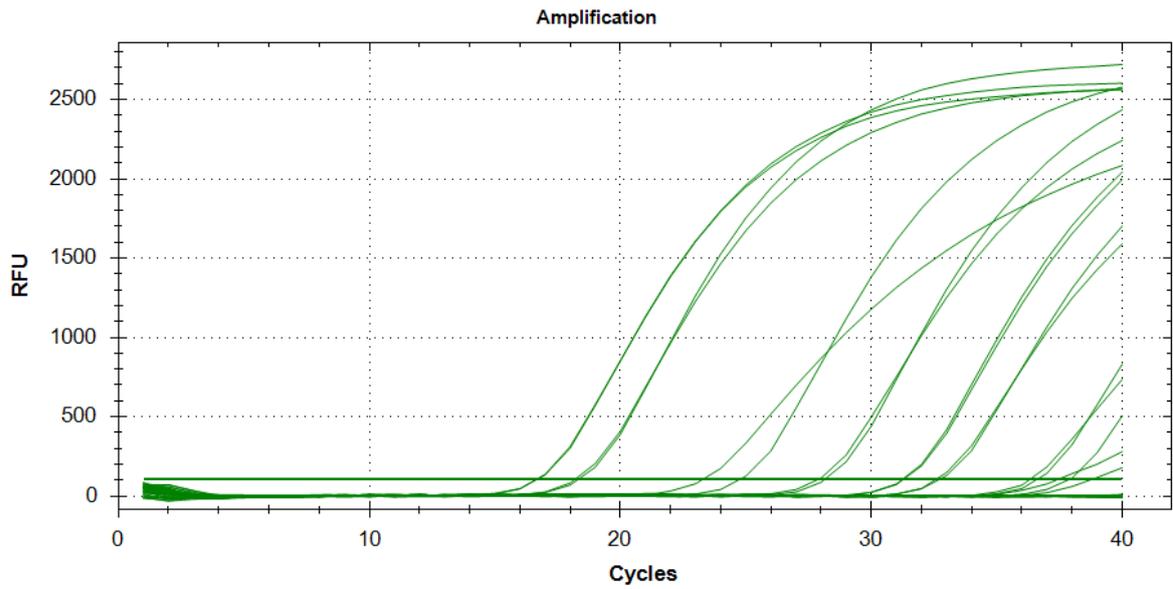
Anexo 3. Curva estándar de concentraciones conocidas (qPCR) de *Rv*.



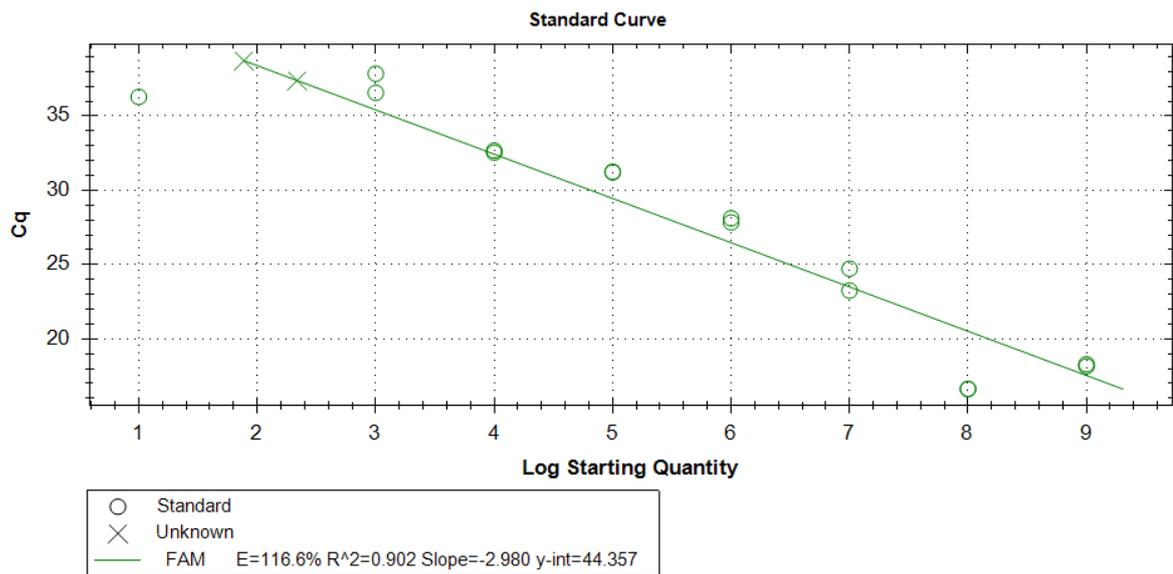
Anexo 4. Ajuste en base a la curva estándar de *Rv*.



Anexo 5. Curva estándar de concentraciones conocidas (qPCR) de *Pr*.



Anexo 6. Ajuste en base a la curva estándar de *Pr*.



Anexo 7. Secuencias, estándares, sondas y primers utilizados en cada reacción de qPCR.

Nombre	Fragmento de ADN
<i>Bd_gBlock</i>	5' – CCT TGA TAT AAT ACA GTG TGC CAT ATG TCA CGA GTC GAA CAA AAT TTA TTT ATT TTT TCG ACA AAT TAA TTG GAA ATT GAA TAA TTT AAT TGA AAA AAA TTA AAA ATA AAT ATT AAA AAC AAC TTT TGA CAA CGG ATC TCT TGG CT – 3'
<i>Pr_gBlock</i>	5' – CCA GCT CCA ATA GCG TAT ATT AAA GTT GTT GCG GTT AAA AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG CCA AGA ACG ACC GTC CTA CCT TCG GGT TTT CGA CCG TGT TGA TCA AGG CAT TCT TCT AGA TTC TAT CTA CTC TTA ATT GTT GTA GAA TTG AAC TAG AAC ATT TAC TTT GAG GAA ATT AGA GTG TTT CAA GCA GGC CTA TGC CTT GAA TAT ATT AGC ATG GAA TAA TAA TTT AGG ACT TCG GTT CTA TTT T – 3'
<i>Rv_gBlock</i>	5' – CCA ACC AGG CGT TGA GGA TGT AAT CCC CCG ACC TGG GAA CGC CGA CCA AAA ACT GCT GCC CGA AAG CCG GGT TAC CCG ACA TCT TGG CAG CCA GAG ACG GCA GCT TGG TGA ACC ACC CCA CGG GGT AG – 3'
<i>Bd forward</i>	5' – AGC CAA GAG ATC CGT TGT CAA A – 3'
<i>Bd reverse</i>	5' – CCT TGA TAT AAT ACA GTG TGC CAT ATG TC – 3'
<i>Bd probe</i>	5' – [6~FAM] CGA GTC GAA CAA AAT [MGBE~Q] – 3'
<i>Pr forward</i>	5' – GAA CGA CCG TCC TAC CTT CGG – 3'
<i>Pr reverse</i>	5' – AGG CCT GCT TGA AAC ACT CT – 3'
<i>Pr probe</i>	5' – [6~FAM] ACC GTG TTG ATC GAG GCA TT [Tamra~Q] – 3'
<i>Rv forward</i>	5' – AAC GCC GAC CGA AAA CTG – 3'
<i>Rv reverse</i>	5' - GCT GCC AAG ATG TCG GGT AA – 3'
<i>Rv probe</i>	5' – [6~FAM] CCG GCT TTC GGG C [MGBE~Q] – 3'