

# El comercio de anfibios y la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en vida libre: ¿dispersión en círculo vicioso?

## Amphibian trade and the presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in free-ranging: dispersion in vicious circle?

Luis M. García-Feria<sup>1,2\*</sup>  
luis.garcia@inecol.mx

Dulce M. Brousset  
Hernández-Jauregui<sup>1</sup>  
brousset@unam.mx

David Vallejo Bravo<sup>3</sup>  
mvzdober@gmail.com

Roberto A. Cervantes Olivares<sup>3</sup>  
raco@unam.mx

### Resumen

El comercio de anfibios tiene un papel importante en la persistencia del *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), ya que al menos 28 especies pueden servir como vectores. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la presencia de Bd en anfibios comercializados en dos mercados de mascotas en la Ciudad de México; además verificamos su presencia en poblaciones silvestres de las especies comerciadas. Se encontró que el 92% de los anfibios comercializados fueron capturados de vida libre, y el 37.3% estuvieron infectados con Bd de acuerdo con análisis histológicos. La prevalencia de 30.8% de Bd en anfibios silvestres fue detectada por amplificación de ADN. No hubo diferencias significativas entre las prevalencias de los anfibios silvestres y de comercio, pero la tendencia es mayor para los anfibios de comercio. La importancia de los planes de conservación de anfibios a nivel mundial ha crecido en los últimos años. El mercado de mascotas y la captura de individuos de vida libre hacen que las rutas de comercio y el manejo de individuos para estos fines sea una forma de dispersión de patógenos y un gran riesgo de brotes de las enfermedades.

**Palabras claves:** Quitridiomycosis, mercado de mascotas, microscopía óptica, PCR anidado.

### Abstract

The amphibian trade has an important role in *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) persistence, for at least 28 amphibian species can serve as vectors. The objectives of this work are to evaluate the presence and prevalence of Bd in amphibian traded in two petshops in Mexico City, as well as to verify their presence in wild amphibian populations of species traded. It was found that 92% of amphibians sold in the two petshops were captured free-living, and 37.3% of these animals were infected with Bd, according to histological analysis. The prevalence of 30.8% of Bd in wild amphibians at the wild capture sites was detected by means of DNA amplification. No significant differences were found between prevalence of wild and trade amphibians, but the trend was higher for trade amphibians. The importance of amphibian management and conservation plans has been growing in the last years. The pet trade and its capture from the wild turn these trade routes and their captive management into means of pathogenic dispersion, which may increase the risk of disease outbreaks.

**Keywords:** Chytridiomycosis, pet trade, optical microscopy, nested PCR.

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, México.

<sup>2</sup> Red de Biología y Conservación de Vertebrados. Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec No. 351. El Haya 91070. Xalapa, Veracruz, México.

<sup>3</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Inmunología y Microbiología. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510, México.

\*Autor de correspondencia

## Introducción

El comercio mundial de fauna silvestre involucra miles de especies en una industria que representa billones de dólares al año (Broad *et al.*, 2003). Particularmente, en el caso de los anfibios se comercian toneladas de individuos destinadas para el mercado de alimentos y de mascotas (Ehrenfeld, 2005).

Uno de los problemas ambientales originados por la globalización es el aumento de especies invasoras exóticas que incluyen patógenos animales, vegetales y humanos (Ehrenfeld, 2005; Schloegel *et al.*, 2012). La contaminación por patógenos puede llegar a ser un 60% de las enfermedades emergentes de la vida silvestre (Schloegel y Daszak, 2004). La mejor opción para regular y controlar la dispersión de éstas enfermedades es la vigilancia continua de los agentes patógenos (Garner *et al.*, 2009). Así, con la continua globalización del mercado de mascotas, vida silvestre, materiales y productos contaminados, la contaminación por patógenos tiende a ser un problema de alta significancia para la salud humana y animal, la salud del ecosistema y la economía en un futuro cercano (Schloegel y Daszak, 2004; Schloegel *et al.*, 2012).

Desde los años 1980's, se han detectado disminuciones y extinciones masivas localizadas de las poblaciones de anfibios de todo el mundo, que coinciden con los brotes de quitridiomycosis (Berger *et al.*, 1998; Daszak *et al.*, 2000; Voyles *et al.*, 2009). Sin embargo, las causas del declive poblacional de los anfibios son complejas, desde la pérdida del hábitat, la contaminación del suelo y de los cuerpos de agua, el calentamiento climático global, el aumento de la radiación UV, la introducción de especies exóticas, hasta la emergencia de agentes patógenos, así como la interacción de estos factores (Wyman, 1990; Lips *et al.*, 2003; Daszak *et al.*, 2004; Schloegel y Daszak, 2004; Weldon *et al.*, 2004). Asimismo, se cree que la dispersión de la quitridiomycosis pudo haber sido por el crecimiento en el mercado internacional de alimentos y del comercio ilegal de mascotas (Picco y Collins, 2008; Schloegel *et al.*, 2012). Existen reportes de que al menos 28 especies de anfibios pueden servir como vectores para el quitrido, siendo *Rhinella marina* (LINNAEUS 1758), *Lithobates catesbeiana* (SHAW 1802) y *Xenopus laevis* (DAUDIN 1802) las especies más distribuidas a nivel mundial (Weldon *et al.*, 2004; Johnson y Speare, 2005; Fisher y Garner, 2007; Picco y Collins, 2008; Garner *et al.*, 2009; Schloegel *et al.*, 2012). Aunque existen reportes de la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* (LONGCORE, PESSIER Y NICHOLS 1999) en México desde los 1980's (Hale *et al.*, 2002, Hale *et al.*, 2005) y en diferentes localidades (Lips *et al.*, 2004; Frías-Álvarez *et al.*, 2008; Luja *et al.*, 2012; Murrieta *et al.*, 2014), el comercio de anfibios también tiene un papel importante en la persistencia del patógeno (Frías-Álvarez *et al.*, 2008).

Los estudios enfocados en la identificación de la presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), de cómo y dónde afecta a una escala poblacional, son importantes para entender el papel de la enfermedad en la conservación de los anfibios. Aunado a esto, estimación de la prevalencia en individuos comercializados ayuda a entender la dinámica en la transmisión de la enfermedad, principalmente cuando las especies son de alta comercialización y no hay un control en su tráfico, en el mantenimiento y disposición de residuos y de especímenes muertos. Nuestros objetivos fueron detectar la presencia y la prevalencia de Bd a mediano plazo a través del diagnóstico por microscopía óptica de tejido dérmico fresco de las especies de anfibios comercializadas en dos mercados de mascotas en la Ciudad de México; además verificamos la presencia y prevalencia de Bd en poblaciones silvestres de anfibios de las especies comercializadas.

## Material y métodos

### Especímenes de comercio

El muestreo de los anfibios se llevó a cabo en dos mercados de mascotas, Nuevo San Lázaro y Emilio Carranza de la Ciudad de México, entre septiembre del 2008 y abril del 2010. Se colectaron ejemplares adultos, juveniles y renacuajos con menos de 72 horas de fallecidos y que presentaran enrojecimiento de la epidermis en el área inguinal, desprendimiento de la epidermis, hiperqueratinización, deformidad o ausencia de las estructuras bucales (según Berger *et al.*, 1998; Nichols *et al.*, 2001; Rachowicz, 2002). Se aplicó una breve encuesta a los propietarios para conocer el lugar de procedencia de las diferentes especies comercializadas en ambos mercados. Los especímenes fueron transportados en bolsas plásticas de cierre hermético y mantenidos a 4°C hasta su procesamiento. Cada ejemplar se identificó con ayuda de manuales y guías de campo de anfibios (Duellam, 1961; Casas y McCoy, 1987; Altamirano y Soriano, 2010). El diagnóstico histológico para determinar la presencia de Bd se realizó mediante el procedimiento sugerido por Longcore *et al.* (1999), que consiste en la observación por microscopía óptica de fragmentos de 2 a 3 mm de tejido dérmico fresco interdigital y de la ingle en el caso de los adultos y juveniles, y las estructuras bucales para los renacuajos, mediante preparaciones húmedas revisadas a 40X y 100X, para buscar zoosporangios en el interior de las células epiteliales.

### Verificación de Bd en vida libre

El muestreo se realizó en los sitios reportados en las encuestas donde los comerciantes obtenían sus ejemplares para venta. Se muestrearon todos los anfibios adultos encontrados que manifestaran o no signos de enfermedad

(como lo recomendado por Berger *et al.*, 1998; Nichols *et al.*, 2001). Todos los individuos fueron manipulados con guantes estériles de látex para evitar la contaminación de la muestra y evitar el riesgo de transmisión de la enfermedad. Se realizó el muestreo por raspados cutáneos con hisopos de rayón (Medical Wire and Equipment, MW 100-100, Biomerieux) como describe Kriger *et al.* (2006) y preservados en viales con 150 µl de buffer de lysis (Longmire *et al.*, 1997). Los animales fueron fotografiados para su posterior identificación y liberados en el sitio de captura.

La extracción de DNA se llevó de acuerdo con la metodología de Miller *et al.* (1988) y las especificaciones del kit de extracción GF-1 Tissue DNA (Vivantis Technologies Sdn. Bhd. Malaysia). La amplificación de fragmentos de 300 pb de DNA fue realizada mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en ensayos anidados (Goka *et al.*, 2009) con volúmenes de 20 µl, que incluyeron 2 µl de DNA, 0.5 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 U de DNA polimerasa y 0.5 mM de cada oligonucleótido. Para la primera reacción se amplificó la región 18S y 28S con los oligonucleótidos específicos Bd18SF1 (5'-TTTG-TACACACCGCCCGTCGC-3') y Bd28SR1 (5'-ATAT-GCTTAAGTTCAGCGGG-3'), usando los parámetros de PCR: 9 min a 95°C para desnaturalización inicial, seguida de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 50°C y 2 min a 72°C y una extensión final de 7 min a 72°C; la segunda reacción fue para la región 5.8 de RNA ribosomal y la región ITS1 e ITS2 con los oligonucleótidos específicos para Bd Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCCAG-3') and Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'), y los parámetros fueron: desnaturalización inicial de 9 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 65°C y 30 s a 72°C con una extensión final de 7 min a 72°C (Goka *et al.*, 2009). Se usó un control positivo de DNA extraído de un cultivo de Bd (JEL-423) y un control negativo de agua destilada estéril sin DNA. Cada muestra se verificó por triplicado para eliminar errores de amplificación y evitar lecturas de falsos negativos. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador.

Para ambos casos, anfibios de comercio y silvestres, se muestran datos descriptivos de las prevalencias de Bd de los ejemplares de las especies encontradas. Una tabla de contingencia evaluada con una prueba de Chi-cuadrada de Pearson con corrección de Yates (Gotelli y Ellison, 2004) fue realizada con el programa Epidat 3.1 ([www.sergas.es](http://www.sergas.es)) para identificar la independencia o asociación de las condiciones (comercio y silvestre) hacia la presencia del Bd. El número de individuos con presencia de Bd tanto de comercio como silvestres, independiente de la especie, fueron comparados con una prueba de U de Mann-Whitney; los datos de la proporción de las prevalencias de Bd en las especies de comercio y silvestres fueron transformados con el arcoseno de la raíz cuadrada y se compararon con una prueba de t-Student

(Gotelli y Ellison, 2004); los análisis se realizaron con el programa SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc.).

## Resultados

### Anfibios de comercio

Las encuestas a los comerciantes de mascotas de los mercados Nuevo San Lázaro y Emilio Carranza mostraron que el 94,9% de los especímenes fueron capturados de poblaciones silvestres en los estados de Morelos, Puebla, Estado de México y Distrito Federal, y solo el 5,1% son especies criadas en cautiverio en los estados de Hidalgo y Morelos. De las nueve especies comerciadas, el 91,5% (n = 6) son endémicas a México y el 8,5% (n = 3) son consideradas exóticas (Tabla 1). *Hyla plicata* (BROCCHI 1877) fue la especie con mayor número de especímenes recuperados.

Los análisis histológicos de los 59 especímenes recuperados confirmaron la presencia de Bd en 22 de ellos (37,3% de prevalencia), siendo *Rhinella marina* y *Lithobates montezumae* (BAIRD 1854) los que tuvieron mayor prevalencia (100% y 75%, respectivamente), seguidas de *Hyla eximia* (36,7%) y *Ambystoma mexicanum* (SHAW Y NODDER 1798) con resultados negativos (Tabla 1).

### Anfibios silvestres

Los 91 individuos muestreados en vida libre correspondieron a siete especies *Ambystoma mexicanum*, *Lithobates montezumae*, *L. spectabilis* (HILLIS Y FROST 1985), *Hyla arenicolor* (COPE 1866), *H. eximia* (BAIRD 1854), *Eleutherodactylus* sp. y *Spea multiplicata* (COPE 1863) (Tabla 1). *Ambystoma mexicanum* y *L. montezumae* fueron individuos del Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca (Universidad Autónoma Metropolitana); estos individuos pertenecen a una colonia cautiva reproductiva para repoblar los canales de Xochimilco. Los *A. mexicanum* se mantienen en estanques al aire libre con agua bombeada directamente de los canales.

La amplificación de DNA mostró la presencia de Bd en 28 de 91 individuos colectados (30,8% de prevalencia). *Ambystoma mexicanum* fue la especie con la mayor prevalencia (75%), seguida de *Lithobates spectabilis* (35,9%) e *Hyla arenicolor* (30,8%). No se detectó ningún individuo con la presencia de Bd en *L. montezumae*, *Eleutherodactylus* sp. y *Spea multiplicata*. Los individuos silvestres de *Hyla eximia* mostraron prevalencias de Bd bajas (6,3 %) (Tabla 1).

La tabla de contingencia mostró que la presencia de Bd no está asociada a la procedencia de los individuos (comercio o silvestres) ( $X^2_{\text{Pearson}} = 0,423$ , g. l. = 1, P = 0,516). De igual forma, no se encontraron diferencias significativas en la comparación del número de individuos con presencia de Bd entre ambas condiciones de origen, comercio y vida libre (U Mann-Whitney = 2509,5; P = 0,411). La compa-

**Tabla 1.** Especies de anfibios comerciados y silvestres con presencia de *Batrachochytrium dendrobatidis* en México. CDMX: Ciudad de México; EMX: Estado de México; HGO: Hidalgo; MOR: Morelos; PUE: Puebla. Categoría de amenaza: A=Amenazada; CR=Peligro crítico; LC=Preocupación menor; Pr=Protección especial.

**Table 1.** Traded and wild amphibian species with *Batrachochytrium dendrobatidis* presence in Mexico. CDMX: Mexico city; EMX: state of Mexico; HGO: Hidalgo; MOR: Morelos; PUE: Puebla. Threat category: A= Threatened; CR = Critically Endangered; LC = Least Concern; Pr = Special Protection.

	Especie	Categoría de amenaza		Sitio	Positivos / número de
		NOM-059	IUCN		individuos examinados
					(% prevalencia)
Comercio	<i>Rhinella marina</i>	-	LC	MOR	1/1 (100)
	<i>Lithobates montezumae</i>	*	Pr	MOR, EMX, PUE	3/4 (75)
	<i>Xenopus laevis</i>			HGO	2/3 (66,7)
	<i>Ambystoma velasci</i>	*	Pr	PUE, EMX	1/2 (50)
	<i>Lithobates pipiens</i>			MOR, EMX	1/2 (50)
	<i>Hyla eximia</i>	*	-	MOR, EMX, CDMX	11/30 (36,7)
	<i>Hyla plicata</i>	*	A	MOR, EMX, CDMX	2/7 (28,6)
	<i>Pachymedusa dacnicolor</i>	*	-	MOR	1/4 (25)
	<i>Ambystoma mexicanum</i>	*	Pr	CDMX	0/6 (0)
	<b>Total</b>				<b>22/59 (37,3)</b>
Silvestres	<i>Ambystoma mexicanum</i>	*	Pr	CDMX	9/12 (75)
	<i>Lithobates spectabilis</i>	*	-	PUE, MOR	14/39 (35,9)
	<i>Hyla arenicolor</i>			PUE, EMX	4/13 (30,8)
	<i>Hyla eximia</i>	*	-	EMX	1/16 (6,3)
	<i>Lithobates montezumae</i>	*	Pr	CDMX	0/6 (0)
	<i>Eleutherodactylus sp.</i>			PUE	0/1 (0)
	<i>Spea multiplicata</i>			PUE, EMX	0/4 (0)
	<b>Total</b>				<b>28/91 (30,8)</b>

Nota: (\*) Especie endémica.

ración de las prevalencias de Bd en las especies indica que no hubo diferencias entre las dos condiciones ( $t = -1,906$ , g. l. = 14,  $P = 0,077$ ); sin embargo, la prevalencia en los anfibios de comercio tiende a ser mayor en este estudio.

## Discusión

El comercio y el tráfico no regulado de anfibios puede exponer a las especies nativas a agentes patógenos afectando negativamente a los esfuerzos de conservación (Cunningham *et al.*, 2003). *Batrachochytrium dendrobatidis* ha sido reportado en el comercio de anfibios con prevalencias mayores al 70%. En nuestros hallazgos verificamos que la presencia del Bd es alrededor del 37% en anfibios comerciados en los mercados de mascotas Nuevo San Lázaro y Emilio Carranza de la Ciudad de México, siendo que más del 90% de las especies provienen de vida libre. Esto puede ser un alto riesgo, ya que la introducción accidental o deliberada de anfibios al medio natural (Daszak *et al.*, 2001; Daszak *et al.*, 2003; Luja y Rodríguez-Estrella, 2010) puede promover la persistencia y diseminación del patógeno (Weldon *et al.*, 2004; Cunningham *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2007).

La mayor parte de las especies evaluadas se comercializan como mascotas no convencionales (p. e. *Agalychnis dacnicolor* COPE 1864); *A. mexicanum* y *R. marina* han sido comerciados desde hace mucho tiempo como medicina tradicional (Ruíz-Boites, 2008); ambas especies las encontramos en ambos mercados, pero solo *R. marina* presentó Bd. No obstante, Bd ha sido reportado en individuos cautivos de *A. mexicanum* con prevalencias por arriba del 80% (Frías-Álvarez *et al.*, 2008; Galindo-Bustos *et al.*, 2014).

Aunque recolectamos animales muertos y el diagnóstico de estos fue por microscopía óptica de tejido dérmico, encontramos porcentajes menores de prevalencia de Bd para *H. eximia* (36,7%) comparados con las altas prevalencias (98–100%) previamente reportadas para la misma especie por Galindo-Bustos *et al.* (2014). *Hyla eximia* es la especie de mayor comercialización en dichos mercados principalmente como alimento para otros animales, lo cual potencialmente puede ser una fuente de transmisión del quítrido. Si bien encontramos un mayor número de especies comerciadas ( $n = 9$ ), la prevalencia total observada de Bd fue menor que en trabajos previos realizados en México (84,6% y 98,2%, Frías-Álvarez *et al.*, 2008 y Galindo-Bustos *et al.*, 2014, respectivamente).

La alta demanda del mercado de anfibios ha promovido la producción intensiva y la captura de individuos silvestres (Schlaepfer *et al.*, 2005; Schloegel *et al.*, 2012). En este caso, el papel de los anfibios cautivos con presencia de Bd puede ser fundamental en la ruta epizootiológica del agente, ya que aunque estos individuos no estén en contacto directo con las poblaciones silvestres, la dispersión del hongo se puede dar por diferentes rutas: los anfibios cautivos que mueren, junto con el agua en la que son mantenidos, generalmente son desechados al drenaje público (Johnson y Speare, 2003); y por escapes o liberaciones debidas a las deficiencias de la infraestructura de mantenimiento y prácticas de manejo, o liberadas intencionalmente para la crianza comercial, adorno de estanques, controladores biológicos y como parte de programas de reintroducción y conservación (Jenning y Hayes, 1985; Luja y Rodríguez-Estrella, 2010). *Xenopus laevis* y *Rhinella marina* han sido reportadas como especies resistentes a la enfermedad y de gran comercialización (Weldon *et al.*, 2004; Johnson y Speare, 2005; Fisher y Garner, 2007), y aunque encontramos pocos individuos en el mercado de mascotas, se detectaron altas prevalencias de Bd en ambas especies.

De acuerdo a nuestros hallazgos y la importancia del mercado de anfibios, recomendamos una vigilancia epidemiológica constante en el manejo de los anfibios comercializados y cautivos para la detección, control eficaz y prevención de la quitridiomycosis. Esto permitirá tener una respuesta rápida a nuevos brotes, así como la restricción del tráfico de anfibios y la aplicación de marcos de higiene y protocolos de cuarentena (Johnson y Speare, 2003; Johnson *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2007). Durante la cuarentena, los individuos deben ser examinados periódicamente para detectar la presencia del quítrido, y todos los animales muertos deben ser evaluados mediante necropsias (Daszak *et al.*, 2001) junto con el diagnóstico por microscopía óptica y ensayos moleculares, ya que muchos individuos infectados pueden parecer clínicamente sanos sin lesiones aparentes (Young *et al.*, 2007). Además, se debe hacer una desinfección de instalaciones, equipo y descontaminación del agua residual (Johnson y Speare, 2003) para evitar la dispersión del quítrido por el drenaje público y disminuir el riesgo de contaminación en ambientes naturales.

Los anfibios, por muchos años, se han considerado como indicadores de la calidad ambiental y del buen funcionamiento de los componentes de los ecosistemas donde habitan; las especies en mayor riesgo son principalmente las que presentan requerimientos de hábitat especializados (Daszak *et al.*, 2003; Lips *et al.*, 2003). En algunos hábitats y en individuos que son muy sensibles, la interacción entre el patógeno, el hospedero y el ambiente pueden favorecer la virulencia del patógeno (Speare y Berger, 2005). En nuestras observaciones de campo no encontramos ningún anfibio con signos de enfermedad, ni muertes masivas que sugiriera la presencia del quítrido como se han reportado en

otros trabajos (Daszak *et al.*, 1999; Daszak *et al.*, 2000). No obstante, aunque pueden existir individuos infectados que parecen clínicamente sanos (Young *et al.*, 2007), encontramos que el 30,8% de los anfibios silvestres provenientes de los estados de donde se extraen para fines comerciales son positivos al Bd, considerándose una prevalencia alta (Guayasamin *et al.*, 2014). Es así que debe regularse la captura de anfibios de vida silvestre para fines comerciales (Cunningham *et al.*, 2003), ya sea para el mercado de mascotas o para medicina tradicional, debido al alto potencial de transmisión de la enfermedad (Schloegel y Daszak, 2004; Ehrenfeld, 2005; Picco y Collins, 2008; Schloegel *et al.*, 2012) y la gravedad en la declinación poblacional de especies nativas (Daszak *et al.*, 1999; Daszak *et al.*, 2003).

De las siete especies silvestres reportadas en este trabajo, tres fueron muy comercializadas en ambos mercados de mascotas (*Ambystoma mexicanum*, *Lithobates montezumae* e *Hyla eximia*). En estado silvestre, *A. mexicanum* no había sido reportado positivo a Bd, aunque no se descartaba (Frías-Álvarez *et al.*, 2008). Nuestros muestreos confirman la presencia del hongo en *A. mexicanum* (75% de prevalencia), siendo de gran riesgo, ya que estos individuos forman parte de una colonia reproductiva con fines de reintroducción y recuperación de la especie. El agua de los estanques donde son mantenidos estos individuos es bombeada del lago de Xochimilco, donde se distribuye naturalmente. Es así que el potencial de transmisión y permanencia de Bd en el hábitat natural de la especie es alto.

Por otro lado, los individuos de *H. eximia* silvestres no mostraron las altas prevalencias encontradas en los individuos de comercio. Probablemente, el estrés producido por las prácticas de manejo en cautiverio incrementa la susceptibilidad a patógenos oportunistas (Kiesecker, 2011). *Lithobates spectabilis* e *Hyla arenicolor* son abundantes en su rango de distribución (Santos-Barrera y Flores-Villela, 2004; Santos-Barrera y Hammerson, 2010) y mostraron prevalencias moderadas del quítrido. Recomendamos el monitoreo de sus poblaciones y de la presencia del quítrido debido a la importancia de su alta comercialización (Ruíz-Boites, 2008). Además de que *L. spectabilis* es una especie endémica (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2010; Santos-Barrera y Flores-Villela, 2004).

La quitridiomycosis es una enfermedad emergente causada por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, que a nivel mundial ha producido numerosos casos de muertes masivas y extinciones locales de poblaciones de anfibios (Berger *et al.*, 1998; Daszak *et al.*, 2000; Voyles *et al.*, 2009). La presentación clínica de esta enfermedad ha sido identificada y confirmada en solo el 14% de las especies amenazadas según la Lista Roja de la UICN (Heard *et al.*, 2011). Aunque la Organización Mundial de Salud Animal considera a la quitridiomycosis como una enfermedad de reporte obligatorio, no existe ninguna normatividad al respecto en México (OIE, 2008), principalmente relacionada

al comercio y tráfico legal de mascotas (Garner *et al.*, 2009). No obstante no hubo diferencias significativas en las prevalencias de Bd en los anfibios silvestres y los de comercio en nuestro trabajo, la tendencia muestra que los anfibios que se comercializan poseen mayor prevalencia del Bd. Esto podría ser una potencial fuente de infección y permanencia del quitridio tanto en la ruta de comercio como hacia animales de vida libre, ya que ninguna de las condiciones predispone la presencia del Bd. Sumado al alto riesgo en las poblaciones silvestres cuando más del 90% de las especies comercializadas son endémicas.

## Conclusiones

La importancia del mercado de anfibios a nivel mundial ha tenido una tendencia creciente a través de los años debido al aumento por el consumo humano, el uso medicinal, así como para el mercado de mascotas, lo que promueve la producción intensiva y la captura masiva de individuos de vida libre (Schlaepfer *et al.*, 2005; Schloegel *et al.*, 2012). Nuestros hallazgos muestran que aunque no hubo diferencias significativas entre las prevalencias de los anfibios silvestres y los de comercio, la tendencia indica que los anfibios de comercio tienen mayor presencia de Bd. Sin embargo, no existen indicios que la condición del comercio sea un factor que predisponga a la presencia del quitridio. Además no es evidente una direccionalidad de la transmisión de Bd, y posiblemente sea un círculo vicioso entre estas condiciones lo que podría hacer más difícil su control.

## Agradecimientos

Al apoyo brindado por la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para el postdoctorado en DEFSAL-FMVZ de LMGF. Centro de Investigaciones Biológicas y Acuícolas de Cuernavaca de la Universidad Autónoma Metropolitana quienes facilitaron el muestreo de *A. mexicanum* y *L. montezumae*. Fahd H. Carmona-Torres (DEFSAL-FMVZ) aportó algunas muestras al monitoreo de poblaciones silvestres. La identificación de algunas especies se realizó con el apoyo de René Murrieta-Galindo. A los dos revisores anónimos por sus comentarios pertinentes.

## Referencias

ALTAMIRANO, A.T.; SORIANO, S.M. 2010. *Anfibios y reptiles. Especies de Alvarado Veracruz*. México, Universidad Nacional Autónoma de México, 100 p.  
 BERGER, L.; SPEARE, R.; DASZAK, P.; GREEN, D.E.; CUNNINGHAM, A.A.; GOGGIN, C.L.; SLOCOMBE, R.; RAGAN, R.A.; HYATT, A.D.; MCDONALD, K.R.; HINES, H.B.; LIPS, K.R.; MARRANTELLI, G.; PARKES, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proceedings of National Academy of Science*, **95**(15):9301-9306. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9031>

BROAD, S.; MULLIKEN, T.; ROE, D. 2003. The nature and extent of legal and illegal trade in wildlife. In: S. OLDFIELD (ed.), *The trade in wildlife: Regulation for conservation*. London, Earthscan Publications Ltd, p. 3-22.  
 CASAS, A.G.; MCCOY, C.J. 1987. *Anfibios y reptiles de México. Claves ilustradas para su identificación*. México, Limusa, 87 p.  
 CUNNINGHAM, A.A.; DASZAK, P.; RODRIGUEZ, J.P. 2003. Pathogen pollution: defining a parasitological threat to biodiversity conservation. *Journal of Parasitology*, **89**(Suppl):S78-S83.  
 DASZAK, P.; BERGER, L.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, H.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*, **287**(5452):443-449. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>  
 DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, **78**(2):103-116. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00179-0)  
 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>  
 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. *Herpetology Journal*, **14**(4):201-207.  
 DUELLAM, W.E. 1961. The amphibians and reptiles of Michoacan, Mexico. *University of Kansas. Publications, Museum of Natural History*, **15**:1v148.  
 EHRENFELD, D. 2005. The environmental limits of globalization. *Conservation Biology*, **19**(2):318-326. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00324.x>  
 FISHER, M.C.; GARNER, T.W.J. 2007. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the international trade in amphibians and introduced amphibian species. *Fungal Biology Reviews*, **21**(1):2-9. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.02.002>  
 FRÍAS-ÁLVAREZ, P.P.; VRENDENBURG, V.T.; FAMILIAR-LÓPEZ, M.; LONGCORE, J.E.; GONZÁLEZ-BERNAL, E.; SANTOS-BARRERA, G.; ZAMBRANO, L.; PARA-OLEA, G. 2008. Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians. *EcoHealth* **5**:18-26. <https://doi.org/10.1007/s10393-008-0155-3>  
 GALINDO-BUSTOS, M.A.; BROUSSET HERNANDEZ-JAUREGUI, D.M.; CHENG, T.; VREDENBURG, V.; PARRA-OLEA, G. 2014. Presence and prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in commercial amphibians in Mexico City. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **45**(4):830-835. <https://doi.org/10.1638/2014-0023.1>  
 GARNER, T.W.J.; STEPHEN, I.; WOMBWELL, E.; FISHER, M.C. 2009. The amphibian trade: bans or best practice? *EcoHealth*, **6**:148-151. <https://doi.org/10.1007/s10393-009-0233-1>  
 GOKA, K.; YOKOYAMA, J.; UNE, Y.; KUROKI, T.; SUZUKI, K.; NAKAHARA, M.; KOBAYASHI, A.; INABA, S.; MIZUTANI, T.; HYATT, A.D. 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Ecology*, **18**(23):4757-4774. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04384.x>  
 GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. 2004. *A primer of ecological statistics*. Sunderland, Sinauer Associates, 510 p.  
 GUAYASAMIN, J.M.; MENDOZA, A.M.; LONGO, A.V.; ZAMUDIO, K.R.; BONACCORSO, E. 2014. High prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in an Andean frog community (Reserva Las Gralarias, Ecuador). *Amphibian & Reptile Conservation*, **8**(1):33-44.  
 HALE, S.F.; ROSEN, P.C.; JARCHOW, J.L.; BRADLEY, G.A. 2002. Effects of the chytrid fungus on the Tarahumara frog in Sonora Mexico. *Abstract in Current Research on Herpetofauna of Sonoran Desert II*, Tucson, AZ.

- HALE, S.F.; ROSEN, P.C.; JARCHOW, J.L.; BRADLEY, G.A. 2005. Effects of the chytrid fungus on the Tarahumara frog (*Rana tarahumarae*) in Arizona and Sonora, Mexico. In: G.J. GOTTFRIED; G. BROOKE; E. LANE; E. CARLETON (comps.), *Connecting mountain islands and desert seas: biodiversity and management of the Madrean Archipelago II*. Fort Collins, CO., USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-36, p. 407-411.
- HEARD, M.; SMITH, K.F.; RIPP, K. 2011. Examining the evidence for Chytridiomycosis in threatened amphibian species. *PLoS ONE*, **6**(8):e23150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023150>
- JENNINGS, M.R.; HAYES, M.P. 1985. Pre-1900 overharvest of the California red-legged frog (*Rana aurora draytonii*): the inducement for bullfrog (*Rana catesbeiana*) introduction. *Herpetologica*, **41**(1):94-103.
- JOHNSON, M.L.; SPEARE, R. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases*, **9**(8):922-925. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030145>
- JOHNSON, M.L.; BERGER, L.; PHILLIPS, L.; SPEARE, R. 2003. Fungicidal effects of chemical disinfectants, UV light, desiccation and heat on the amphibian chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **57**(3):255-260. <https://doi.org/10.3354/dao057255>
- JOHNSON, M.L.; SPEARE, R. 2005. Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Diseases of Aquatic Organism*, **65**(3):181-186. <https://doi.org/10.3354/dao065181>
- KIESECKER, J.M. 2011. Global stressors and the global decline of amphibians: tipping the stress immunocompetency axis. *Ecological Research* **26**(5):897-908. <https://doi.org/10.1007/s11284-010-0702-6>
- KRIEGER, K.M.; HERO, J.M.; ASHTON, K.J. 2006. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of Aquatic Organism*, **71**(2):149-154.
- LIPS, K.R.; MENDELSON III, J.R.; MUÑOZ-ALONSO, A.; CANSECO-MÁRQUEZ, L.; MALCAHY, D.G. 2004. Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biological Conservation*, **119**(4):555-564. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.01.017>
- LIPS, K.R.; REEVE, J.D.; WITTERS, L.R. 2003. Ecological traits predicting amphibian population declines in Central America. *Conservation Biology*, **17**(4):1078-1088. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01623.x>
- LONGCORE, J.E.; PESSIER, A.P.; NICHOLS, D.K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. Et sp. Nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, **91**(2):219-227. <https://doi.org/10.2307/3761366>
- LONGMIRE, J.L.; MALTBIE, M.; BAKER, R.J. 1997. Use of "lysis buffer" in DNA isolation and its implications for museum collections. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*, 163:1-3.
- LUJA, V.H.; RODRÍGUEZ-ESTRELLA, R. 2010. The invasive bullfrog *Lithobates catesbeianus* in oases of Baja California Sur, Mexico: potential effects in a fragile ecosystem. *Biological Invasions*, **12**(9):2979-2983. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9713-z>
- LUJA, V.H.; RODRÍGUEZ-ESTRELLA, R.; RATZLAFF, K.; PARRA-OLEA, G.; RAMÍREZ-BAUTISTA, A. 2012. The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in isolated populations of the Baja California treefrog *Pseudacris hypochondriaca curta* in Baja California Sur, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, **57**(3):323-327. <https://doi.org/10.1894/0038-4909-57.3.323>
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **16**(3):1215.
- MURRIETA-GALINDO, R.; PARRA-OLEA, G.; GONZÁLEZ-ROMERO, A.; LÓPEZ-BARRERA, F.; VREDENBURG, V.T. 2014. Detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians inhabiting cloud forests and coffee agroecosystems in central Veracruz, Mexico. *European Journal of Wildlife Research*, **60**(3):431-439. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0800-9>
- NICHOLS, D.K.; LAMIRANDE, E.W.; PESSIER, A.P.; LONGCORE, J.E. 2001. Experimental transmission of cutaneous chytridiomycosis in *Dendrobatid* frogs. *Journal of Wildlife Diseases*, **37**(1):1-11. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.1.1>
- PICCO, A.M.; COLLINS, J.P. 2008. Amphibian commerce as a likely source of pathogen pollution. *Conservation Biology*, **22**(6):1582-1589. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.01025.x>
- RACHOWICZ, L.J. 2002. Mouthpart pigmentation in *Rana muscosa* tadpoles: Seasonal changes without chytridiomycosis. *Herpetology Review*, **33**(4):263-265.
- RUIZ-BOITES, M. 2008. *Uso y comercialización de anfibios y reptiles de cuatro mercados del Distrito Federal*. Ciudad de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- SANTOS-BARRERA, G.; FLORES-VILLELA, O. 2004. *Lithobates spectabilis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org>. Acceso el: 09/02/2016.
- SANTOS-BARRERA, G.; HAMMERSON, G. 2010. *Hyla arenicolor*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org>. Acceso el: 09/02/2016.
- SCHLAEPFER, M.A.; HOOVER, C.; DODD JR, C.K. 2005. Challenges in evaluating the impact of the trade in amphibians and reptiles on wild populations. *Bioscience*, **55**(3):256-264. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0256:CIETIO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0256:CIETIO]2.0.CO;2)
- SCHLOEGEL, L.M.; DASZAK, P. 2004. Conservation medicine: Tackling the root causes of emerging infectious diseases and seeking practical solutions. *Wildlife Tracks*, **8**(4):2-7.
- SCHLOEGEL, L.M.; TOLEDO, L.F.; LONGCORE, J.E.; GREENSPAN, S.E.; VIEIRA, C.A.; LEE, M.; ZHAO, S.; WANGEN, C.; FERREIRA, C.M.; HIPOLITO, M.; DAVIES, A.J.; CUOMO, C.A.; DASZAK, P.; JAMES, T.Y. 2012. Novel, panzootic and hybrid genotypes of amphibian chytridiomycosis associated with the bullfrog trade. *Molecular Ecology*, **21**(21):5162-5177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05710.x>
- SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*, México, 30 de diciembre.
- SPEARE, R.; BERGER, L. 2005. Chytridiomycosis in amphibians in Australia. Disponible en: <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyspec.htm>. Acceso el: 06/11/2015.
- VOYLES, W.F.; DINUDOM, A.; COOK, D.; WEBB, R.; ALFORD, R.A.; SKERRATT, L.F.; SPEARE, R. 2009. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science*, **326**(5952):582-585. <https://doi.org/10.1126/science.1176765>
- WELDON, C.; DU PREEZ, L.H.; HYATT, A.D.; MULLER, R.; SPEARE, R. 2004. Origin of the amphibian chytrid fungus. *Emerging Infectious Diseases*, **10**(12):2100-2105. <https://doi.org/10.3201/eid1012.030804>
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). 2008. *Aquatic animal health code*. World Organisation for Animal Health, Paris.
- WYMAN, R.L. 1990. What's happening to the amphibians? *Conservation Biology*, **4**:350-352.
- YOUNG, S.; BERGER, L.; SPEARE, R. 2007. Amphibian chytridiomycosis: strategies for captive management and conservation. *International Zoo Yearbook*, **41**(1):85-95. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2007.00010.x>

Submitted on May 2, 2016

Accepted on November 26, 2016