

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



**Detección de agentes infecciosos y efecto de la contaminación
sobre ranas de vidrio (Anura: Centrolenidae) en una microcuenca urbana
de San José, Costa Rica**

Lic. Gabriela Pérez Gómez

Universidad Nacional, Heredia, julio, 2025

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en
Ciencias Veterinarias Tropicales para optar por el grado académico de Magíster en
Enfermedades Tropicales.**

**Detección de agentes infecciosos y efecto de la contaminación sobre ranas de vidrio
(Anura: Centrolenidae) en una microcuenca urbana de San José, Costa Rica**

Gabriela Pérez Gómez

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales para optar por el grado académico de Magíster en Enfermedades Tropicales.

Miembros del Tribunal Examinador

M.Sc. Randall Gutiérrez Vargas / Dra. Damaris Castro García / Dr. Jorge Herrera Murillo /
Dr. José Vega Baudrit / Dr. Greivin Rodríguez Calderón / Dra. Rocío Castillo Cedeño
Representante del Consejo Central de Posgrado

Dra. Julia Rodríguez Barahona
Coordinadora a.i. del Posgrado o su representante

PhD. Gaby Dolz Wiedner
Tutora de tesis

M.S.c. Josimar Estrella Morales
Miembro del comité Asesor

PhD. Gilbert Alvarado
Miembro del comité Asesor

Gabriela Pérez Gómez
Sustentante

Resumen general

Los anfibios están siendo amenazados por varias razones, una de ellas, son las enfermedades emergentes y reemergentes como el *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), *Ranavirus 3* (RV-3) y bacterias zoonóticas. El objetivo de esta investigación buscó detectar Bd, RV-3, *Chlamydia* spp. y *Brucella* spp. en dos especies de ranas de vidrio en zonas urbanas de San José, Costa Rica y asociar los agentes infecciosos con resultados del examen objetivo general (EOG) y el índice de condición corporal (ICC). Se capturaron individuos adultos de *Hyalinobatrachium fleischmanni* y *Espadarana prosoblepon* en tres sitios del río Torres en los años 2019 y 2021, a los que se les determinó el EOG e ICC. Muestras de órganos e hisopados de la piel y la cloaca se analizaron mediante pruebas moleculares para determinar la presencia de los agentes infecciosos. Todos los animales mostraron valores de EOG e ICC dentro de los parámetros normales. Se detectó la presencia de Bd en ambas especies de ranas en dos sitios (Finca Pizote y Parque del Este) y de RV-3 en *E. prosoblepon* en Guadalupe. *Chlamydia* spp. se encontró en ambas especies de ranas y en los tres sitios. Se detectó por primera vez la presencia de Bd en *H. fleischmanni*, RV-3 en *E. prosoblepon* y las bacterias *Chlamydia* spp. y *Achromobacter* spp. en ambas especies de ranas de vidrio. Se recomienda seguir realizando estudios para determinar la presencia y el efecto de agentes infecciosos en anfibios de Costa Rica. *E. prosoblepon* es una de 15 especies de ranas de vidrio de Costa Rica que vive en ríos urbanos expuesto a contaminación por desechos orgánicos, industriales, farmacológicos, agropecuarios y pesticidas, entre otros. Es por esto que, el presente estudio pretendió determinar el efecto de la contaminación del agua sobre el crecimiento y desarrollo de los renacuajos de *E. prosoblepon*, así como detectar en éstos la presencia de agentes infecciosos. Se recolectaron masas de huevos de *E. prosoblepon* y se colocaron en cuatro terrarios con agua de tres sitios diferentes del río Torres (T1: Finca Pizote, T2: Parque del Este y T3: Guadalupe) y T4: con agua destilada como control. Los renacuajos se observaron por cuatro meses, determinando cada dos días el comportamiento, movimientos de natación, alimentación, supervivencia, longitud, coloración y estado de desarrollo de Gosner. Los huevos se analizaron molecularmente para determinar la presencia del hongo quitridio, *Ranavirus 3* y especies de bacterias de *Chlamydia* y *Brucella*. Al iniciar el estudio se realizó un análisis de los parámetros fisicoquímico y microbiológico del agua de los tres sitios. Se determinó diferencia significativa entre los tratamientos con respecto a la duración de la salida de los renacuajos del agua ($H = 13,12$; $gl = 3$; $p = 0,0044$). Así los renacuajos del T1

y T4 duraron más días en llegar a metamorfosis con respecto al T3 y T2 (HSD = 10,05; $p < .05$ y HSD = 12,46; $p < .05$ respectivamente). Los terrarios T1 y T4 fueron en los que se estableció mayor supervivencia de los huevos hasta metamorfosis, además se determinó la mayor duración en días de los renacuajos en el agua hasta iniciar la etapa terrestre. Cinco de los parámetros medidos en el agua (saturación oxígeno, sólidos sedimentables totales, coliformes fecales, demanda bioquímica de oxígeno y fosfatos) se encontraron fuera de los límites establecidos para aguas superficiales en los tres sitios de muestreo, siendo los coliformes fecales el parámetro más desigual (para T1, T2, y T3: 712 N.M.P/mL, 6870 N.M.P/mL y 24196 N.M.P/mL, respectivamente). El ICA-NSF clasificó el agua utilizada en T1 y T2 como aguas con mediana calidad, mientras que el agua del T3 resultó de mala calidad. No se detectaron agentes infecciosos en las masas de huevos, a excepción de una especie de bacteria *Achromobacter*. Se recomienda continuar investigando el efecto de los coliformes fecales sobre los renacuajos *E. prosoblepon* y repetir estos experimentos utilizando mayor cantidad de huevos. Además, es importante establecer si *Achromobacter* es parte de la microbiota la piel de las ranas de vidrio urbanas.

Agradecimientos

De todo corazón le agradezco primeramente a Dios, mi mejor consejero, guía y padre amoroso por darme siempre las fuerzas para concluir mis metas y llenarme de paz durante el proceso. A mi esposo Sergio por estar conmigo en cada etapa de este proyecto y apoyarme tanto en trabajo de campo como en el laboratorio, por su paciencia en casa y siempre levantarme los ánimos. Agradezco a mi papá y a mi mamá por siempre creer en mí como profesional y apoyarme en todo con sus palabras de ánimo, oraciones y compañía aún en el campo y laboratorio. Gracias infinitas a mis hermanos y sobrinos por la compañía en el laboratorio mientras yo trabajaba los fines de semana o feriados y por apoyarme en mi carrera siempre. A mis amigos por siempre tener una palabra de aliento para perseverar y llegar a la meta. Le agradezco profundamente a mi tutora por siempre brindarme su apoyo, por presentarme profesionales tan importantes y admirables que me ayudaron durante el desarrollo de la tesis, así como los fondos invertidos y el tiempo de calidad dedicado a este proyecto. Un agradecimiento muy especial al doctor Tobías Eisenberg y al doctor Alberto Alberti por los consejos, los protocolos facilitados, los análisis de muestras y guía brindada durante el desarrollo de la tesis. A Josimar Estrella y Joseph Vargas por todo el apoyo y los consejos brindados para el cuidado de los animales, procesamiento y toma de datos de los animales en cautiverio. A Luis Vargas, Paola Gastezzi, María José Zuniga, Javier Varela, María José Alvarado, Sergio Quesada, Antonio Pérez, María Elena Gómez, Sebastián Pérez, Camila Binns, todos los guardas de seguridad y choferes, así como al departamento de Servicios Generales de la Universidad Estatal a Distancia (UNED) por la colaboración durante el proceso de cuidado de los animales en cautiverio en el Laboratorio de Vida Silvestre y Salud (LAVIS) de la Vicerrectoría de Investigación de la UNED. A todo el personal del Laboratorio de Zoonosis y Entomología Médica de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (UNA) por el apoyo brindado para los análisis de muestras moleculares, en especial a María José Zuniga y Javier Varela quienes estuvieron conmigo durante todo el proceso de análisis molecular, brindándome su conocimiento y compañía. Al Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) y a la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO) por los permisos de investigación, tenencia en cautiverio y análisis moleculares realizados en este proyecto.

Dedicatoria

Quiero dedicar este logro a Dios, a mi esposo, a mi bebé Nicolás y a mis padres. El completar esta meta me llena de mucha satisfacción personal y agradecimiento, porque no se logra nada sin la guía de Dios y una buena red de apoyo y, gracias a Dios, yo lo tuve durante todo este proceso que unas veces fue difícil y otras veces más difícil aún, pero siempre feliz de estar completando mis sueños.

Este trabajo requirió de mucha investigación de campo, de laboratorio y por supuesto de escritorio para completar el proceso de escritura científica. En esta última etapa de escritura la realicé ya con mi bebé en el vientre y luego recién nacido, por eso es tan significativo para mi estar culminando esta etapa, con la cual pretendo enseñarle a Nicolás que siempre se pueden alcanzar los sueños con mucho esfuerzo y amor a tu trabajo.

Además, esta tesis lleva otra etapa muy fuerte en mi vida que fue la enfermedad de mi papá y el milagro maravilloso que hizo Dios con él, hoy en medio de su rehabilitación logro completar mis estudios para honrrarlo a él como papá y agradecerle siempre su lucha continua y su esfuerzo por siempre inculcarme junto con mi mamá la importancia de la integridad y el valor de los estudios en mi vida.

Finalmente, agradezco mucho a Dios poder trabajar con las ranas de vidrio, animales que me apasionan desde que soy una niña y con los cuales quiero seguir investigando para su protección y conservación en la naturaleza. Estos animales fascinantes guardan mucha ciencia que aún falta por descubrir y que pretendo, con la ayuda de Dios, continuar elaborando proyectos de investigación con alto impacto no sólo científico sino también para la sociedad.

Índice

Miembros del Tribunal Examinador	3
Resumen general	5
Agradecimientos	7
Índice	9
Lista de cuadros	10
Lista de figuras	11
Introducción general	12
Agentes infecciosos emergentes en ranas de vidrio	15
<i>Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)</i>	15
<i>Ranavirus</i>	17
<i>Chlamydia spp.</i>	18
<i>Brucella spp.</i>	18
Renacuajos como bioindicadores de contaminación hídrica.....	19
Bibliografía	21
Artículo I	24
Artículo II	50
Discusión general	70
Bibliografía	76
Conclusiones generales	88
Recomendaciones generales	89

Lista de cuadros

Artículo 1	Página
Cuadro 1. Agentes a analizar en las muestras de órganos internos e hisopados de piel recolectados en ranas de vidrio en tres sitios del río Torres, en San José, Costa Rica, durante los años 2019-2022. -----	30
Cuadro 2. Técnicas moleculares utilizadas para detectar Bd, <i>Ranavirus</i> 3, <i>Chlamydia</i> spp. y <i>Brucella</i> spp. en ranas de vidrio de la microcuenca del río Torres, San José, Costa Rica. -----	34
Cuadro 3. Agentes infecciosos detectados en muestras de ranas de vidrio del río Torres, San José, Costa Rica. -----	36
Artículo 2	Página
Cuadro 1. Técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real (qPCR) utilizadas para detectar agentes infecciosos en los huevos de <i>E. prosoblepon</i> (Anura: Centrolenidae) en la microcuenca del río Torres, San José, Costa Rica. -----	57-58
Cuadro 2. Descripción del desarrollo larval de cuatro masas de huevos de <i>Espadarana prosoblepon</i> (Anura: Centrolenidae) en cuatro tratamientos de agua con diferentes niveles de contaminación hídrica. -----	59
Cuadro 3. Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua de los tres sitios de estudio del río Torres de San José, Costa Rica; utilizados en los terrarios T1, T2 y T3. -----	60

Lista de figuras

Introducción general	Página
Figura 1. Características morfológicas y ecológicas de <i>Hyalinobatrachium fleischmanni</i> -----	12
Figura 2. Características morfológicas y ecológicas de <i>Espadarana prosoblepon</i> -----	13
Figura 3. Ciclo biológico del hongo Bd en anfibios -----	16
Artículo 1	Página
Figura 1. Sitios de recolecta de ranas de vidrio en la microcuenca del río Torres, San José, Costa Rica. 1: Finca Pizote, 2: Parque del Este, 3: Guadalupe. -----	28
Artículo 2	Página
Figura 1. Sitios de recolecta de agua para la crianza de renacuajos de <i>E. prosoblepon</i> en la microcuenca del río Torres, San José, Costa Rica -----	55
Figura 2. Descripción de la clasificación de los estadios larvales según Gosner (1960). -----	56

Introducción general

Las ranas de vidrio son anuros endémicos del Neotrópico, que pertenecen a la familia Centrolenidae (Mendoza et al., 2019). La riqueza de especies se concentra en las cadenas montañosas, donde la humedad es alta y las quebradas proporcionan los hábitats requeridos para la reproducción, refugio y alimentación (Cisneros-Heredia et al., 2010; Mendoza et al., 2019). En el continente americano se han reportado 153 especies de ranas de vidrio, de las cuales 15 se encuentran en Costa Rica y dos de ellas (*Hyalinobatrachium fleischmanni* y *Espadarana prosoblepon*) habitan, además, en ríos de la Gran Área Metropolitana (Kubicki, 2007; Rojas-Morales et al., 2014).

Las ranas de vidrio poseen características únicas, como el vientre translúcido, permitiendo observar órganos internos como corazón, arteria ventral, pulmones, estómago, intestino y huevos en el caso de las hembras. Son relativamente pequeñas, la longitud del cuerpo varía entre los 20-84 mm desde el hocico hasta la cloaca (Savage, 2002; Kubicki, 2007). Además, se sabe que las ranas de vidrio tienen fidelidad de sitio, por lo que se restringen en movilidad y variabilidad genética poblacional (Mendoza et al., 2019).

La rana de vidrio de Fleischmann (*H. fleischmanni*) se encuentra ampliamente distribuida desde México hasta Ecuador y es de las especies más pequeñas de los centrolénidos. La longitud varía entre 22 y 27 mm, su vientre es transparente, debido a que el peritoneo parietal carece de coloración, mientras que los órganos internos poseen una cubierta visceral blanca que los protege y los hace menos visibles (Figura 1). Durante la época reproductiva los machos se colocan sobre las hojas cercanas al agua, haciendo llamados constantes a las hembras, las masas de huevos (20-30 aproximadamente) son colocadas generalmente en el envés de la hoja, donde el macho realiza patrullajes y puede cuidar una o varias masas de huevos a la vez, protegiéndolos de depredadores y asegurando la eclosión de los huevos. Los renacuajos son de color rosado y generalmente se encuentran en el fondo del río o quebrada, donde se alimentan de detritos y materia orgánica (Kubicki, 2007; Delia et al., 2014; Mendoza et al., 2019).

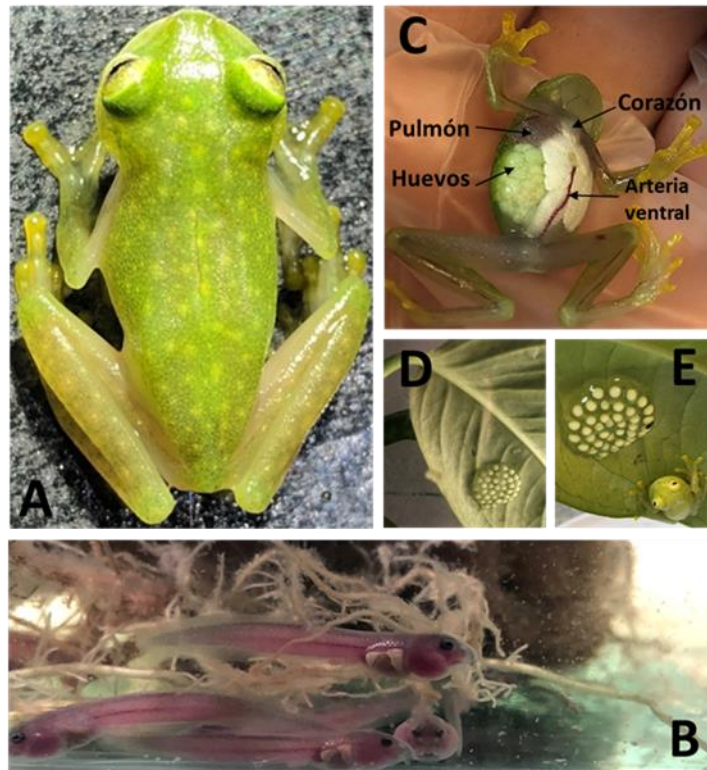


Figura 1. Características morfológicas y ecológicas de *Hyalinobatrachium fleischmanni*. A) Adulto, manchas corporales amarillas estrelladas; B) Renacuajos rosados; C) Principales órganos traslucidos; D) Masa de huevos; E) Macho en cuidado parental.

Por otro lado, la rana de vidrio esmeralda (*E. prosoblepon*) es de tamaño mediano, las hembras tienen una longitud de hocico-cloaca de 25 a 31mm y los machos entre 23 y 28mm; en la región ventral se observa al menos las tres cuartas partes cubiertas por peritoneo parietal blanco, mientras que los órganos poseen una cubierta visceral traslucida, al contrario que *H. fleischmanni*; sus huesos en vida se observan color azul-verdoso y los machos, principalmente, poseen una estructura en los hombros llamada “espinas humerales” que es una característica distintiva de los machos de la especie, para adherirse a la hembra durante la reproducción o para el combate con otros machos (Figura 2). Al igual que *H. fleischmanni*, los machos cantan sobre las hojas para llamar a las hembras y una vez realizado el amplexo pueden permanecer adheridos hasta 3 horas; a diferencia de la rana de vidrio de Fleischmann, colocan los huevos en el haz de las hojas, con posturas entre 20 y 45 huevos (Kubicki, 2007; Basto-Riascos et al., 2017).

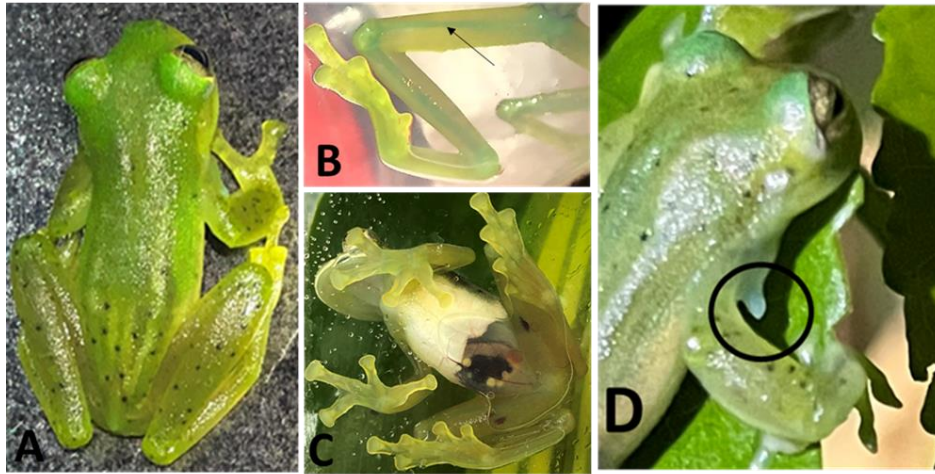


Figura 2. Características morfológicas y ecológicas de *Espadarana prosoblepon*. A) Adulto con manchas negras en el dorso; B) Coloración verde de los huesos; C) Peritoneo color blanco; D) Espina humeral.

La rana de Fleischmann y la rana Esmeralda son especies que se encuentran en preocupación menor debido a su amplia distribución geográfica en todo Centroamérica hasta el norte de Argentina (Basto-Riascos et al., 2017; UICN, 2022). Sin embargo, esto podría cambiar porque están siendo afectadas por diversas causas, dentro de las principales están la contaminación y la destrucción de su hábitat, la emergencia y reemergencia de agentes infecciosos y el calentamiento global.

Las poblaciones de anfibios urbanos se encuentran expuestas a la contaminación y destrucción de sus hábitats, debido principalmente a las actividades que desarrollan los seres humanos. Por un lado, la urbanización (carreteras, casas de habitación, edificios, industria, entre otros) en sus hábitats ocasiona impermeabilización de los suelos y pérdida de los cuerpos de agua, lo que evita el establecimiento de sus poblaciones y dificulta el intercambio genético, interrumpiendo la variabilidad genética, lo cual va debilitando la calidad de los genes de las futuras generaciones de ranas (Homola et al., 2019; Peng et al., 2021). Por el otro lado, al verter desechos agrícolas, industriales y de viviendas a los ríos, alteran las condiciones fisicoquímicas (pH, oxígeno disuelto, conductividad), y microbiológicas (coliformes fecales, sólidos disueltos, entre otros) del agua, además de la contaminación con pesticidas (nitritos y sulfatos, metales pesados, y otros) que afectan el crecimiento, desarrollo y supervivencia de estos anfibios (Abad et al., 2017; Basanta, 2019; Scheele et al., 2019;

Sievers et al., 2019; Peng et al., 2021). Aunado a esto, el aumento de la temperatura ambiental, producto del calentamiento global, generará trastornos fisiológicos hidrotermales y una reducción de hasta el 30% del estado de hidratación del cuerpo de la rana; ocasionando problemas en la aptitud física de éstas (Nowakowski et al., 2017; Greenberg & Palen, 2021).

Finalmente, en zonas urbanas existe el riesgo de que las poblaciones de renacuajos estén expuestos a contaminación orgánica y química en el agua en el que se desarrollan y a agentes antropozoonóticos (*Chlamydia* y *Brucella*), así como otras bacterias Gram negativas típicas de ríos urbanos como *Escherichia coli*, la cual es utilizada ampliamente como indicador de contaminación (Gibimma et al., 2023). Además, es posible la introducción de esporas del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) con el calzado de los humanos (Scheele et al., 2019), como también la emergencia de *Ranavirus* de anfibios descritos recientemente en Costa Rica (Whitfield et al., 2021).

Agentes infecciosos emergentes en ranas de vidrio

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd)

La quitridiomycosis es una enfermedad emergente en anuros, ocasionada por el agente etiológico *B. dendrobatidis* conocido como Bd. Es un hongo saprobio facultativo y por su baja especificidad infecta un amplio rango de anuros (ranas) y urodelos (salamandras) (DiRenzo et al., 2018). Los anfibios infectados pueden presentar afectación a nivel de la epidermis provocando una interrupción de la osmorregulación y, además, puede causar daños en órganos internos, debido a la producción de micotoxinas que alteran las funciones normales de las células, generando infecciones letales (Voyles et al., 2007).

En la actualidad se cuenta con poca información sobre la transmisión inter e intraespecífica, se sabe que los anfibios son los principales hospederos (tanto salamandras como ranas), por lo menos en 700 especies de anfibios se ha detectado la presencia de Bd a nivel mundial (DiRenzo et al., 2018). Puede darse una reinfección del hospedero por las zoosporas que se producen con la infección existente, o con las zoosporas ubicadas en otros reservorios ambientales (fuera del hospedero) u otros hospederos infectados (DiRenzo et al., 2018). El hongo tiene la capacidad de sobrevivir fuera del hospedero hasta tres meses en diversos

sustratos, como en arena del río, en exoesqueletos de artrópodos, en algas, hasta se ha detectado en las plumas de aves acuáticas, y debido a que ellas se desplazan por largas distancias, pueden transportar el hongo a otras localidades y así infectar anfibios de otras localidades (Garmyn et al., 2012).

La etapa del ciclo de Bd que ocurre en el agua, inicia con las zoosporas flageladas que buscan por quimiotaxis los anfibios a infectar, adhiriéndose, enquistándose y desarrollándose luego dentro de la célula epidérmica del anfibio, produciendo zoosporangios, donde se desarrollan las zoosporas, las cuales regresan al medio nuevamente (Sewell et al., 2021).

Otros autores reportan el desarrollo de Bd en tres etapas, lo cual se muestra en la Figura 3: el ingreso de zoosporas (forma infectante) a través de la piel (en adultos) o cavidad oral (en renacuajos) las cuales se enquistan y forman los rizoides o ramificaciones que permiten que las zoosporas se puedan anclar y formar colonias. Luego se reabsorbe el flagelo de la zoospora y ocurre un engrosamiento de la pared celular que da lugar al esporangio, etapa final, en la que se da la reproducción celular en regiones queratinizadas de adultos y renacuajos, donde finalmente se forman más zoosporas que reinician el ciclo (Bosch, 2003; Velásquez et al., 2007; Angeli et al., 2015; DiRenzo et al., 2018; Basanta, 2019; Scheele et al., 2019; Bravo & Moreno, 2020). En los renacuajos el ciclo de vida del hongo se adapta a las diferentes etapas de crecimiento del renacuajo. La región queratinizada ubicada en la cavidad oral del renacuajo es donde se da la última etapa del ciclo, cuando aparecen zonas queratinizadas en el renacuajo, el hongo libera las zoosporas que iniciarán el ciclo y estos renacuajos pueden o no morir, dependiendo de las condiciones de su sistema inmunológico (Berger et al., 2005).

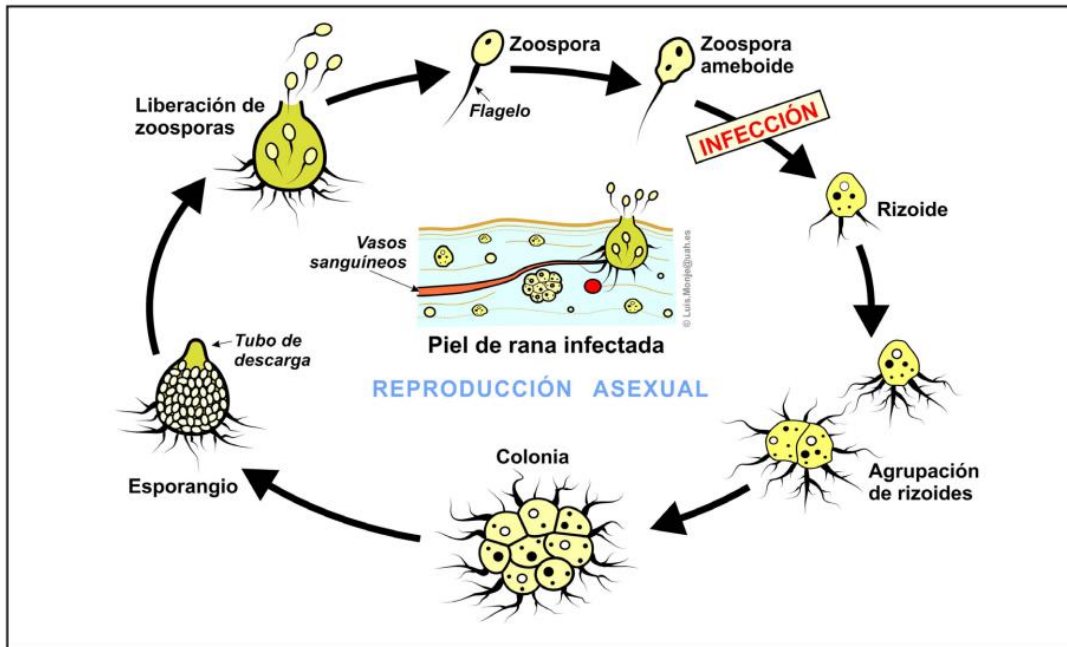


Figura 3. Ciclo biológico del hongo Bd en anfibios, tomado de Bravo y Moreno (2020).

Ranavirus

Los ranavirus pertenecen a la familia Iridoviridae, género *Ranavirus*; y fueron aislados de poiquilotermos (anfibios, reptiles y peces) (Murphy et al., 2012). El virus está distribuido en todos los continentes, se ha encontrado en 52 familias de vertebrados (18 de anfibios), incluyendo Centrolenidae. Hasta la fecha se ha reportado en tres especies de ranas de vidrio en Costa Rica: *E. prosoblepon*, *Hyalinobatrachium colymbiphylum* y *Teratohyla spinosa* (Duffus et al., 2015; OIE, 2021). La transmisión de los ranavirus ocurre de forma horizontal, mediante contacto directo entre individuos infectados y sanos, o por ingesta de partículas virales que se encuentran en cuerpos de agua, suelos u otras superficies contaminadas. Se desconoce si se da transmisión vertical (OIE, 2019; OIE, 2021).

Se conocen siete especies de *Ranavirus* (ICTV, 2022). El *Ranavirus 3* (RV-3) infecta a las ranas ingresando por lesiones en la piel o la cavidad oral, a donde se replica en células epiteliales e inmunológicas (macrófagos), formando cuerpos de inclusión intranucleares y citoplasmáticos. En los macrófagos permanecen en forma silente, hasta que ocurre una supresión del sistema inmunológico, producto de estrés ambiental o de otros agentes infecciosos, ocasionando la infección de hígado, bazo, riñones y sistema gastrointestinal, donde provoca efecto citopático. Los signos clínicos son úlceras, edemas, hemorragias en la

piel y fallo de órganos tres semanas post infección, dependiendo de la virulencia de la cepa de RV3 infectante y de la susceptibilidad de la rana (King et al., 2012; Basanta, 2019; OIE, 2019; OIE, 2021).

Las ranas en etapa de huevo muestran mayor resistencia a las infecciones por *Ranavirus*, debido a la capa gelatinosa protectora que funciona como una barrera física y la cual tiene características antivirales naturales. En etapas metamórficas y juveniles la patogenicidad del virus es mayor, debido al aumento de actividad en esas etapas, en las que buscan alimento en diversos espacios, y compiten por el territorio y la reproducción, lo que los expone en mayor grado al virus. En etapas adultas la infección dependerá del sistema inmunológico, ranas menos susceptibles podrán controlar la infección (Earl & Gray, 2014).

Chlamydia spp.

Estas bacterias intracelulares obligadas se clasifican dentro del orden Chlamydiales, familia Chlamydiaceae, conocidas por causar infecciones tanto en animales como en seres humanos (Burnard et al., 2016). La presencia de la bacteria se ha detectado en una gran variedad de animales silvestres sanos y enfermos, como mamíferos, marsupiales, anfibios, reptiles y peces (Burnard et al., 2016; Mitura et al., 2017; Eisenberg et al., 2020). En la rana africana (*Xenopus laevis*) Eisenberg y colaboradores (2020) describieron las lesiones ocasionadas por esta bacteria: hepatomegalia, distensión de la vesícula biliar, esplenomegalia, cambios degenerativos e inflamatorios en los riñones, epicarditis y miocarditis, mientras que Reed y colaboradores (2000) describieron en la rana africana (*Xenopus tropicalis*) lesiones como piel edematosa, daños en hígado e intestinos y secreciones gelatinosas en piel.

La transmisión de esta bacteria en vida silvestre se desconoce; sin embargo, Falsey y Walsh (1993; Burnard et al., 2016) sugieren que la transmisión se da por contacto directo, por contaminación del ambiente con la bacteria o por fómites contaminados.

Brucella spp.

Las bacterias Gram negativas intracelulares que pertenecen al orden Rhizobiales, familia Brucellaceae son importantes agentes zoonóticos a nivel mundial (Ficht, 2010; Glabman et al., 2021). Las especies de este género se clasifican en clásicas (*Brucella melitensis*, *Brucella*

suis, *Brucella abortus*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* y *Brucella neotomae*), de animales marinos (*Brucella ceti* y *Brucella pinnipedialis*), de primates babuinos (*Brucella papionis*), de zorros (*Brucella vulpis*) y especies atípicas (*Brucella microti* y *Brucella inopinata*) (Glabman et al., 2021). En un estudio realizado en el sapo marino común (*Rhinella marina*) se reportaron dos individuos positivos a *B. inopinata*, uno presentó derrame celómico leve, pericarditis linfocítica y peritonitis fibrinosa, mientras que el otro no presentó síntomas aparentes, dejando evidencia de que algunos individuos podrían cursar infecciones subclínicas (Glabman et al., 2021). En otro estudio Kimura et al. (2017) aislaron cepas del género *Brucella* de ranas toro africana (*Pyxicephalus adspersus*), arborícola de ojos grandes (*Leptopelis vermiculatus*) y arbórea de White (*Litoria caerulea*). En las primeras dos se detectó *B. inopinata*, que compartieron secuencias con cepas aisladas de humanos, mientras que en la última se detectó una nueva cepa.

Renacuajos como bioindicadores de contaminación hídrica

Las condiciones naturales y el estado de conservación de los riachuelos y quebradas que frecuentan las ranas de vidrio son esenciales para un adecuado desarrollo y estado de salud general de las ranas adultas; debido a su piel permeable que puede absorber fácilmente contaminantes hídricos, y porque el ciclo de vida en sus primeras etapas de desarrollo ocurre en el agua, por lo que el contacto directo es inevitable (Santos et al., 2015; Strong et al., 2017).

La etapa de desarrollo inicial de renacuajo es la etapa en la que los animales están más expuestos y son más susceptibles a contaminantes en el agua. Por esta razón, estos animales también son utilizados como bioindicadores de la calidad ambiental (Strong et al., 2017). Los primeros estudios realizados a principios de los años ochenta establecieron que pH bajos inhibían la fertilización y el desarrollo embrionario, alteraban el balance iónico, provocando malformaciones, reduciendo el crecimiento y la sobrevivencia, mientras que los pesticidas ocasionaron signos claros de estrés, los cuales se demostraron mediante medición de la acetilcolinesterasa en músculos, la cual se encontró en altos niveles, ocasionando supresión del sistema inmunológico y haciendo a las ranas más propensas a enfermedades infecciosas (Santos et al., 2015).

Otros investigadores detectaron aumentos en el coeficiente de variación del tamaño del genoma a través del uso de citometría de flujo. La eutrofización, el pH elevado, el poco oxígeno disuelto, altas temperaturas y niveles altos de amonio o amoniaco (propio de ambientes agrícolas y urbanos) generaron sobre todo efectos negativos al desarrollo embrionario, debido a que generó un desequilibrio iónico que provocó retraso en el crecimiento o malformaciones (Boyer & Grue, 1995).

En cinco especies de ranas comunes urbanas de Australia, Sievers y colaboradores (2019) comprobaron que la mayor afectación para la supervivencia de las ranas, no fue la exposición constante a contaminantes sino la disponibilidad de vegetación cercana al humedal, concluyendo, que una expansión urbana desproporcionada y sin planificación, no sólo era nociva para las ranas en cuanto a la contaminación hídrica, sino sobre todo debido a la reducción de su hábitat para refugio y reproducción.

Se ha establecido una disminución de poblaciones de anfibios por diversas razones: contaminantes en ríos y fuentes de agua debido a actividades humanas, transformaciones de ríos por asentamientos humanos (Basanta, 2019; Díaz-García, 2019; Aguilar-López et al., 2020), emergencia o reemergencia de agentes infecciosos (hongos, virus, bacterias y parásitos) (Basanta, 2019) y el calentamiento global (Basanta, 2019); que podrían incidir en la extinción de estos animales.

Dos especies de ranas de vidrio (*E. prosoblepon* y *H. fleischmanni*) se encuentran en la microcuenca del río Torres, el cual se considera uno de los ríos más contaminados de San José, porque se encuentra rodeado de asentamientos humanos, descargando constantemente contaminantes orgánicos y químicos en sus aguas (Trujillo-Acosta et al., 2017). Esta contaminación ambiental y la presencia de agentes infecciosos antrópicos podrían estar afectando el desarrollo y la salud de las ranas (Montalvão et al., 2018). Hasta la fecha se reportan pocas investigaciones en Costa Rica que hayan estudiado agentes infecciosos que afectan a las ranas de vidrio.

En el 2017 se estableció la disminución de poblaciones de la especie de *E. prosoblepon* debido al hongo *B. dendrobatidis* (Basto-Riascos et al., 2017), además, se encontró la

presencia de Bd en una de dos ranas de *E. prosoblepon* investigadas en la Zona Protectora de Las Tablas, en el sur de Costa Rica (Abarca et al. 2021). En el 2021 Whitfield y colaboradores (2021) encontraron la presencia de *Ranavirus* en *E. prosoblepon* (10/26, 38,5%) de la Estación Biológica Las Cruces de San Vito de Coto Brus (Whitfield et al., 2021). Sin embargo, no se ha estudiado la presencia de agentes infecciosos como Bd, *Ranavirus*, *Brucella* spp. y *Chlamydia* spp. en ranas de vidrio de zonas urbanas; así como, el efecto de estos agentes y de la contaminación hídrica sobre el desarrollo de estas ranas en Costa Rica.

Bibliografía

- Abad, L., Mejía, D., León, P., Cárdenas, I., Pacheco, B., & Tonon, M. D. (2017). Calidad del Agua y Variables Ambientales en Hábitats para Anfibios Amenazados en la Zona Urbana de Cuenca. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, (18), 18-34.
- Abarca, J. G., Whitfield, S. M., Zúñiga-Chaves, I., Alvarado, G., Kerby, J., Murillo-Cruz, C., & Pinto-Tomás, A. A. (2021). Genotyping and differential bacterial inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* in threatened amphibians in Costa Rica. *Microbiology*, 167(3), 001017.
- Aguilar-López, J. L., Ortiz-Lozada, L., Pelayo-Martínez, J., Mota-Vargas, C., Alarcón-Villegas, L. E., & Demeneghi-Calatayud, A. P. (2020). Diversidad y conservación de anfibios y reptiles en un área protegida privada de una región altamente transformada en el sur de Veracruz, México. *Acta zoológica mexicana*, 36, e3612164. <https://doi.org/10.21829/azm.2020.3612164>.
- Basanta, M. D. (2019). Ecología y evolución de enfermedades emergentes en anfibios: una revisión de ranavirus y quitridiomycosis. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 2(1), 9-25.
- Basto-Riascos, M. C., López-Caro, J., & Londoño-Guarnizo, C. A. (2017). *Espadarana prosoblepon*. *Anfibios y Reptiles*, 52.
- Boyer, R., & Grue, C. E. (1995). The need for water quality criteria for frogs. *Environmental Health Perspectives*, 103(4), 352-357.
- Cisneros-Heredia, D. F., Delia, J., Yáñez-Muñoz, M. H., & Ortega-Andrade, H. M. (2010). Endemic Ecuadorian glassfrog *Cochranella mache* is Critically Endangered because of habitat loss. *Oryx*, 44(1), 114-117. <https://doi.org/10.1017/S0030605309990640>.

- de Vergara, R. S., Hoyos, D. A. G., Alvarado, G., Abarca, J. G., Estrella, J., Schipper, J., & Maya, J. F. G. (2022). Prevalencia del hongo quitridio en la “especie abanderada” *Atelopus varius* (Anura, Bufonidae), Zona Protectora las Tablas, Costa Rica. *UNED Research Journal*, 14(S1), e3880-e3880.
- Díaz-García, J. M. (2019). Servicios ecosistémicos de los anfibios en México: un análisis de diversidad, distribución y conservación. *Etnobiología*, 17(1), 49-60.
- Greenberg, D. A., & Palen, W. J. (2021). Hydrothermal physiology and climate vulnerability in amphibians. *Proceedings of the Royal Society B*, 288(1945), 20202273.
- Grupo de Investigación de Biología Matemática y Matemática Aplicada (GIBIMMA), Grupo de Investigación en Biotecnología Microbiana & Grupo de Investigación en Salud Pública. (2023). *Escherichia coli* y colifagos somáticos: bioindicadores de contaminación fecal en el Lago Guamuez. Editorial Universidad de Nariño.
- Homola, J. J., Loftin, C. S., & Kinnison, M. T. (2019). Landscape genetics reveals unique and shared effects of urbanization for two sympatric pool-breeding amphibians. *Ecology and evolution*, 9(20), 11799-11823. <https://doi.org/10.1002/ece3.5685>.
- IUCN. (2022). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>. Consultado [08 de noviembre de 2023].
- Kubicki, B. (2007). *Ranas de vidrio de Costa Rica*. Primera edición, Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Costa Rica.
- Mendoza, A. M., Bolívar-García, W., Vázquez-Domínguez, E., Ibáñez, R., Parra-Olea, G. (2019). The role of Central American barriers in shaping the evolutionary history of the northernmost glassfrog, *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Anura: Centrolenidae). *PeerJ*, 3(7), e6115. <https://doi.org/10.7717/peerj.6115>.
- Montalvão, M. F., daSilva-Castro, A. L., deLima-Rodrigues, A. S., deOliveira-Mendes, B., & Malafaia, G. (2018). Impacts of tannery effluent on development and morphological characters in a neotropical tadpole. *Science of the Total Environment*, 610-611, 1595-1606. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.134>.
- Nowakowski, A. J., Watling, J. I., Whitfield, S. M., Todd, B. D., Kurz, D. J., & Donnelly, M. A. (2017). Tropical amphibians in shifting thermal landscapes under land-use and climate change. *Conservation biology*, 31(1), 96-105. <https://doi.org/10.1111/cobi.12769>

- Peng, L., Liang, G. F., & Qiu, P. W. (2021). Effects of microhabitat characteristics on amphibian diversity in urban water system of Kaifeng, Henan, China. *The journal of applied ecology*, 32(7), 2597-2603. <https://doi.org/10.13287/j.1001-9332.202107.038>.
- Rojas-Morales, J. A., Castro-Gómez, A., & Escobar-Lasso, S. (2014). Joyas de los Andes tropicales: Colombia tierra de Ranas de Cristal. *Bioma*, 19(2), 1-38.
- Santos, T., Melo, R., Costa-Silva, D., Nunes, M., Rodrigues, N., & Franco, J. (2015). Assessment of water pollution in the Brazilian Pampa biome by means of stress biomarkers in tadpoles of the leaf frog *Phyllomedusa iheringii* (Anura: Hylidae) *PeerJ*, 3, e1016 <https://doi.org/10.7717/peerj.1016>.
- Savage, J. M. (2002). *The amphibians and reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas*. University of Chicago press.
- Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A. A., Burrowes, P. A., Carvalho, T., Catenazzi, A., De la Riva, I., Fisher, M. C., Flechas, S. V., Foster, C. N., Frías-Álvarez, P., Garner, T. W. J., Gratwicke, B., Guayasamin, J. M., Hirschfeld, M., ... Canessa, S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434), 1459-1463. <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>
- Sievers, M., Hale, R., Swearer, S. E., & Parris, K. M. (2019). Frog occupancy of polluted wetlands in urban landscapes. *Conservation Biology*, 33(2), 389-402.
- Strong, R., Martin, F. L., Jones, K. C., Shore, R. F., & Halsall, C. J. (2017). Subtle effects of environmental stress observed in the early life stages of the Common frog, *Rana temporaria*. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Trujillo-Acosta, A., Peraza-Estrella, M. J., Marina-Hipólito, J. G., & Boraschi, S. F. (2017). Evaluación del Corredor Interurbano Río Torres, Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 14(34), 53-62.
- Whitfield, S. M., Alvarado-Barboza, G., Abarca, J. G., Zumbado-Ulate, H., Jiménez, R. R., & Kerby, J. (2021). Ranavirus is widespread in Costa Rica and co-occurs with threatened amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms*, 144, 89-98.

Artículo I

Detección molecular de agentes infecciosos en ranas de vidrio (Anura: Centrolenidae) de zonas urbanas de San José, Costa Rica

Resumen

Los anfibios están siendo amenazados por varias razones, una de ellas, son las enfermedades emergentes y reemergentes como el *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), *Ranavirus 3* (RV-3) y bacterias zoonóticas. El objetivo de esta investigación fue detectar Bd, RV-3, *Chlamydia* spp. y *Brucella* spp. en dos especies de ranas de vidrio en zonas urbanas de San José, Costa Rica y asociar los agentes infecciosos con resultados del examen objetivo general (EOG) y el índice de condición corporal (ICC). Se capturaron individuos adultos de *Hyalinobatrachium fleischmanni* y *Espadarana prosoblepon* en tres sitios del río Torres en los años 2019 y 2021, a los que se les determinó el EOG e ICC. Muestras de órganos e hisopados de la piel y la cloaca se analizaron mediante pruebas moleculares para determinar la presencia de los agentes infecciosos. Todos los animales mostraron valores de EOG e ICC dentro de los parámetros normales. Se detectó la presencia de Bd en ambas especies de ranas en dos sitios (Finca Pizote y Parque del Este) y de RV-3 en *E. prosoblepon* en Guadalupe. *Chlamydia* spp. se encontró en ambas especies de ranas y en los tres sitios. Se detectó por primera vez la presencia de Bd en *H. fleischmanni*, RV-3 en *E. prosoblepon* y las bacterias *Chlamydia* spp. y *Achromobacter* spp. en ambas especies de ranas de vidrio. Se recomienda seguir realizando estudios para determinar la presencia y el efecto de agentes infecciosos en anfibios de Costa Rica.

Palabras clave

Hyalinobatrachium fleischmanni, *Espadarana prosoblepon*, *Ranavirus 3*, *Chlamydia* spp., *Brucella* spp., *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Abstract

Amphibians are threatened for several reasons, including emerging and re-emerging diseases such as *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd), *Ranavirus 3* (RV-3) and zoonotic bacteria. The objective of this research was to detect Bd, RV-3, *Chlamydia* spp. and *Brucella* spp. in two species of glass frogs in urban areas of San José, Costa Rica and associate infectious

agents with results of the objective general examination (EOG) and body condition index (BCI). Adult individuals of *Hyalinobatrachium fleischmanni* and *Espadarana prosoblepon* were captured at three sites on the Torres River in 2019 and 2021 to with the EOG and BCI were determinate. Molecular test analyzed organ samples and swabs of the skin and cloaca to determine the presence of infectious agents. All animals showed EOG and BCI values within normal parameters. The presence of Bd was detected in both species of frogs at two sites (Finca Pizote and Parque del Este) and RV-3 in *E. prosoblepon* in Guadalupe. *Chlamydia* spp. was found in both frog species and at all three sites. The presence of Bd was detected for the first time in *H. fleischmanni*, RV-3 in *E. prosoblepon*, and the bacteria *Chlamydia* spp. and *Achromobacter* spp. in both glass frog species. It is recommended to continue carrying out studies to determine the presence and effect of infectious agents in amphibians of Costa Rica.

Keywords

Hyalinobatrachium fleischmanni, *Espadarana prosoblepon*, *Ranavirus 3*, *Chlamydia* spp., *Brucella* spp. and *Batrachochytrium dendrobatidis*.

1. Introducción

En el continente americano se han reportado 166 especies de ranas de vidrio, de las cuales 15 se encuentran en Costa Rica y dos de ellas (*Hyalinobatrachium fleischmanni* y *Espadarana prosoblepon*) en zonas urbanas (Kubicki, 2007; Rojas-Morales et al., 2014; AmphibiaWeb, 2024).

Los estudios sobre la salud de las ranas de vidrio (Centrolenidae) de Costa Rica se han enfocado en tres temáticas principalmente: 1- la presencia de *B. dendrobatidis*, reportado en seis especies: *Hyalinobatrachium colymbiphyllum*, *Hyalinobatrachium valerioi*, *Cochranella granulosa*, *Espadarana prosoblepon*, *Teratohyla pulverata* y *Teratohyla spinosa* (Hughey et al., 2017; Levorse, 2018; Zumbado-Ulate et al., 2019; Abarca et al., 2021), 2- La detección del RV-3 reportado hasta la fecha en tres especies *E. prosoblepon*, *H. colymbiphyllum* y *T. spinosa* (Duffus et al., 2015; Whitfield et al., 2021; OIE, 2021), y 3- La descripción de la microbiota bacteriana presente en la piel que al parecer inhibe el crecimiento del Bd en: *E. prosoblepon* y *T. spinosa* (Abarca et al., 2021). En países cercanos

como Panamá se ha trabajado con centrolénidos y las interacciones de la microbiota con patógenos en una zona conservada y específicamente con *E. prosoblepon* (Küng et al., 2014; Rebollar et al., 2016; Levorse, 2018).

Los anuros poseen una piel permeable en la que habitan bacterias que conforman su microbiota, y ésta actúa como primera línea de defensa ante diversos microorganismos ambientales (Walke et al., 2011; Küng et al., 2014; Zhang et al., 2024). Sobre todo, en zonas urbanas, existe un alto riesgo de introducir patógenos antropozoonóticos como *Brucella* spp. y *Chlamydia* spp., o esporas del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) con el calzado de los humanos (Scheele et al. 2019). Recientemente se descubrió en Costa Rica la aparición de un agente infeccioso nuevo, el *Ranavirus* 3 (RV-3) (Whitfield et al., 2021).

Por ejemplo, la quitridiomycosis es una enfermedad emergente ocasionada por el agente etiológico *B. dendrobatidis*. Este un hongo saprobio facultativo y por su baja especificidad infecta un amplio rango de anuros (ranas) y urodelos (salamandras) (DiRenzo et al., 2018). Los anfibios infectados pueden presentar afectación a nivel de la epidermis por la interrupción de la osmorregulación y, además, puede causar daños en órganos internos, debido a la producción de micotoxinas que alteran las funciones normales de las células, generando infecciones letales (Voyles et al., 2007). El hongo tiene la capacidad de sobrevivir fuera del huésped hasta tres meses en diversos sustratos, como en arena del río, en exoesqueletos de artrópodos, en algas, hasta se ha detectado en las plumas de aves acuáticas, y debido a que ellas se desplazan por largas distancias, pueden transportar el hongo a otras localidades y así infectar anfibios de otras localidades (Garmyn et al., 2012). El ingreso de zoosporas (forma infectante) ocurre por lesiones en la piel de los adultos, o por la cavidad oral en renacuajos (Bosch, 2003; Velásquez et al., 2007; Angeli et al., 2015; DiRenzo et al., 2018; Basanta, 2019; Scheele et al., 2019; Bravo & Moreno, 2020).

El *Ranavirus* está distribuido en todos los continentes y en tres especies de ranas de vidrio (Whitfield et al., 2013; Duffus et al., 2015; OIE, 2021; Whitfield et al., 2021). Se conocen siete especies de *Ranavirus* (ICTV, 2022), una de ellas, RV-3, infecta a las ranas ingresando por lesiones en la piel o la cavidad oral, a donde se replica en células epiteliales e inmunológicas (macrófagos). En los macrófagos permanecen en forma silente, hasta que

ocurre una supresión del sistema inmunológico, producto de estrés ambiental o de otros agentes infecciosos, ocasionando la infección de hígado, bazo, riñones y sistema gastrointestinal, donde provoca efecto citopático. Los signos clínicos son úlceras, edemas, hemorragias en la piel y fallo de órganos tres semanas post infección, dependiendo de la virulencia de la cepa de RV-3 infectante y de la susceptibilidad de la rana (King et al., 2012; Basanta, 2019; OIE, 2019; OIE, 2021).

Dentro de las bacterias zoonóticas en zonas urbanas, se encuentra *Chlamydia* spp., una bacteria intracelular obligada, conocida por causar infecciones tanto en animales como en seres humanos (Burnard et al., 2016). Este agente ha sido detectado en animales silvestres sanos y enfermos, como mamíferos, marsupiales, anfibios, reptiles y peces (Burnard et al., 2016; Mitura et al., 2017; Eisenberg et al., 2020). En dos especies de ranas africanas (*Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*) se describieron lesiones como hepatomegalia, distensión de la vesícula biliar, esplenomegalia, cambios degenerativos e inflamatorios en los riñones, epicarditis, miocarditis, piel edematosa, daños en hígado e intestinos y secreciones gelatinosas en piel (Reed et al., 2000; Eisenberg et al., 2020).

Otra bacteria intracelular de reciente importancia en la investigación de anfibios es la *Brucella* spp., la cual es de importancia zoonótica a nivel mundial (Ficht, 2010; Glabman et al., 2021). Hasta la fecha existe solamente un estudio realizado en el sapo marino común (*Rhinella marina*), en el que se logró identificar la presencia de la especie *Brucella inopinata*. Algunos de los síntomas clínicos reportados en el sapo fueron derrame celómico leve, pericarditis linfocítica y peritonitis fibrinosa, pero también se establecieron infecciones subclínicas (Glabman et al., 2021). Otras especies de ranas en las que se aislaron especies de *Brucella* fueron: la rana toro africana (*Pyxicephalus adspersus*) y la rana arborícola de ojos grandes (*Leptopelis vermiculatus*) y arbórea de White (*Litoria caerulea*) (Kimura et al., 2017).

La presencia de estos agentes infecciosos en anfibios urbanos de Costa Rica no ha sido estudiada hasta la fecha, por lo que el propósito de esta investigación fue detectar la presencia de Bd, RV-3, *Chlamydia* spp. y *Brucella* spp. en dos especies de ranas de vidrio urbanas (*H. fleischmanni* y *E. prosoblepon*) en la microcuenca del río Torres, San José, Costa Rica.

2. Materiales y métodos

2.1 Área de estudio

El proyecto se desarrolló en el río Torres, ubicado en la provincia de San José, Costa Rica. Este río atraviesa los cantones de Goicoechea, San José y La Carpio; nace en el distrito de Rancho Redondo y desemboca en el río Virilla, sector La Carpio. Posee una altitud máxima de 2040 m.s.n.m. y una mínima de 900 m.s.n.m (Pérez-Gómez et al., 2018). Se presentan tres zonas de vida de acuerdo con el sistema de clasificación de Holdridge (1982): en la parte alta bosque muy húmedo montano bajo, en la parte media bosque muy húmedo premontano, y bosque húmedo premontano en la parte baja de la microcuenca cuenca del río Torres (Espinoza y Villalta, 2004).

Los tres sitios de estudio se ubicaron en la parte alta (un sitio) y media (dos sitios) de la microcuenca y difirieron con relación al nivel de contaminación hídrica, disponibilidad de vegetación cercana al río y expansión de zonas urbanas. El primer sitio se ubicó en la Finca de la Municipalidad de la Unión de Tres Ríos (Finca Pizote), rodeado de bosque secundario maduro y nacientes de varias quebradas, el agua ha sido reportada con pocos contaminantes microbiológicos y químicos, así como poca expansión del parche urbano (Trujillo-Acosta et al., 2017; Pérez-Gómez y Jiménez-Rocha, 2024). El segundo sitio correspondió al Parque del Este, perteneciente al cantón de Sabanilla, un espacio en el que se conservan relictos de bosque secundario en regeneración y se considera como “pulmón verde del cantón de Montes de Oca”, permitiendo albergar gran cantidad de flora y fauna urbana; sin embargo, la quebrada que atraviesa el parque y desemboca en el río Torres, ha sido reportada como moderadamente contaminada con coliformes fecales (Trujillo-Acosta et al., 2017; Pérez-Gómez y Jiménez-Rocha, 2024). El tercer sitio se ubicó en Guadalupe, una zona con alto porcentaje urbano, pero conservando la vegetación a orillas del río como parte de la zona protectora; sin embargo, la contaminación hídrica se estableció como alta y se percibieron olores desagradables del agua, presencia de desechos sólidos y coliformes fecales (Trujillo-Acosta et al., 2017; Pérez-Gómez y Jiménez-Rocha, 2024) (Figura 1).

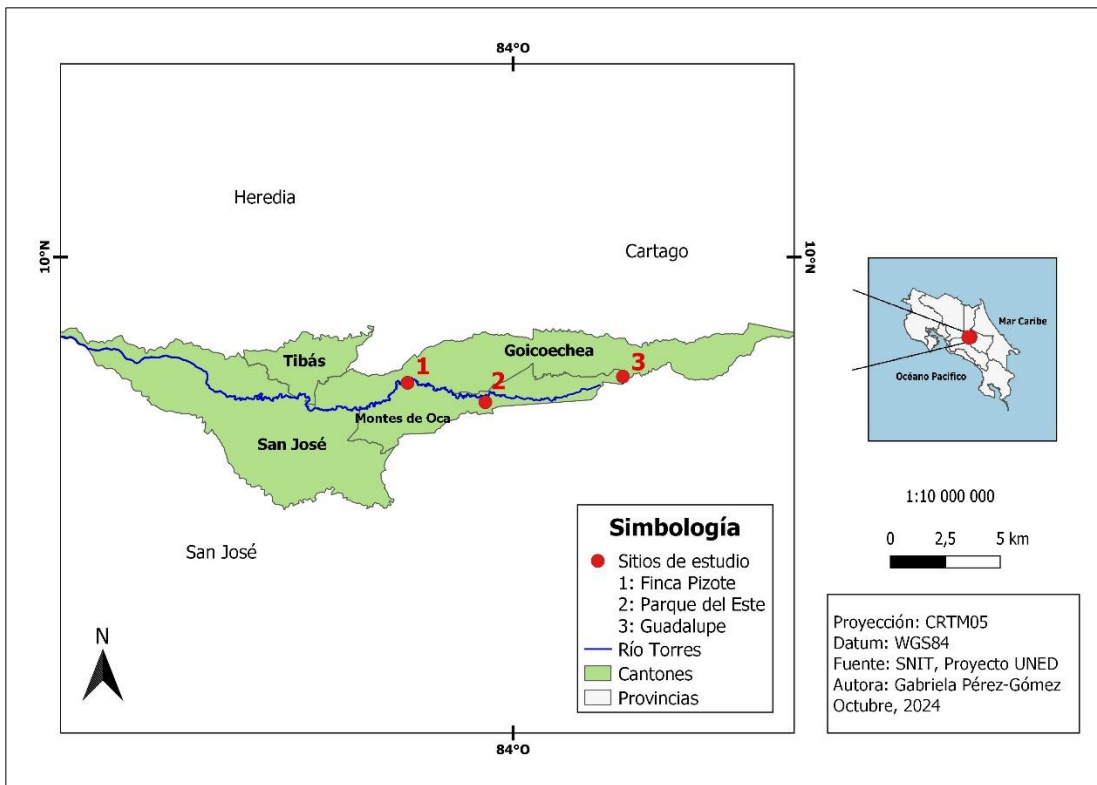


Figura 1. Sitios de recolecta de ranas de vidrio en la microcuenca del río Torres, San José, Costa Rica. 1: Finca Pizote, 2: Parque del Este, 3: Guadalupe.

2.2. Obtención de muestras y examen objetivo general

Para esta investigación se obtuvieron los permisos correspondientes otorgados por la Comisión Nacional de Biodiversidad (CONAGEBIO, permiso: R-010-2023-OT-CONAGEBIO) y el Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC), tanto para la recolecta y tenencia de los individuos, como para el procesamiento molecular de las muestras.

Se realizó un estudio descriptivo transversal en el que se procesaron las muestras de tejidos blandos (hígado e intestino) e hisopados de piel, bucales y cloacales para la detección de cuatro agentes infecciosos en las ranas *H. fleischmanni* y *E. prosoblepon*. Entre los años 2019 y 2021 se capturaron 20 ranas (7 *H. fleischmanni* y 13 *E. prosoblepon*), de los cuales se analizó el intestino e hígado. En el año 2022 se capturaron 14 ranas (6 *H. fleischmanni* y 8 *E. prosoblepon*) y a estos se les tomaron hisopados de piel, bucales y cloacales, posteriormente fueron liberadas.

Las ranas de vidrio de ambas especies se capturaron, identificaron y se sometieron a un examen objetivo general (EOG) adaptado a anfibios (Pérez-Gómez et al. 2018). El índice de condición corporal (ICC) se estimó según lo descrito por Bancila et al. (2010). El EOG consistió en una valoración de forma sistemática, iniciando por la cabeza y finalizando con los miembros inferiores, con el fin de evaluar su condición de salud. Las partes del cuerpo de la rana valoradas fueron: la nariz (para identificar la presencia de lesiones o secreciones inusuales), los ojos (movimiento y reflejo de parpadeo para monitoreo del estado neurológico e hidratación de la membrana nictitante), la cavidad oral (coloración y apariencia de las mucosidades y membranas internas), región dorsal (de forma visual y táctil para constatar, si el individuo se encontraba con bajo peso), los brazos (para medir el grosor e identificar adelgazamiento de los miembros y establecer la presencia de enrojecimientos), las manos (para observar el estado de las falanges), los muslos (grosor de los miembros y la presencia de enrojecimientos), los pies (estado de las falanges), la piel (mucosidad de la piel, presencia de lesiones o protuberancias inusuales), el peso (con el uso de una balanza se pesó a todos los individuos), la medida hocico-cloaca (mediante el uso de una regla especializada se tomó esta medición para determinar el tamaño de cada individuo), estado etario (renacuajo, sub-adulto y adulto) y sexo (por diferencias en longitud corporal entre hembras y machos). Se evaluó la condición general mediante una escala simple del 1 al 3, donde 1 era buena, 2 media y 3 mala. El ICC se calculó con el Índice de Fulton (K) para anfibios (Bancila et al. 2010), se requirió el peso (P), la medición hocico-cloaca (MHC), con la siguiente fórmula: $K = (P / MCH^3) \times 10^5$.

Las 20 ranas capturadas entre el 2019 y 2021 en los tres sitios (Cuadro 1) se sometieron a EOG, posteriormente se sacrificaron con benzocaína en gotas, la cual se colocó en la región pélvica hasta que se constató la pérdida total de signos vitales, procedimiento realizado bajo supervisión veterinaria. Posteriormente, las ranas se congelaron a -20°C en tubos plásticos cónicos con agua destilada hasta realizar el análisis molecular. Las 14 ranas capturadas en el 2022 en los tres diferentes sitios (Cuadro 1) se sometieron al EOG y seguidamente se tomaron dos muestras de hisopado. Este procedimiento, siguió todas las medidas de bioseguridad y esterilidad recomendados, a fin de salvaguardar tanto la especie en estudio, como la protección de los investigadores y la muestra tomada. Los hisopados tomados para detectar *B. dendrobatidis* (Hisopo 1) siguieron el procedimiento descrito por Vredenburg, & Briggs

(2007), el cual consistió en frotar el hisopo y deslizarlo 30 veces en la superficie inferior o vientre de la rana, ingle, piernas, membranas interdigitales, secando el hisopo al aire por aproximadamente cinco minutos y conservándolo en seco en un tubo plástico a 4°C hasta realizar la extracción de ADN. El segundo hisopo (Hisopo 2) se tomó para detectar la presencia de especies de *Brucella* y *Chlamydia*, y se tomaron en la cavidad oral (labios de la rana) y en la cloaca, se conservaron de la misma forma que para Bd (Cuadro 1).

Cuadro 1. Agentes a analizar en las muestras de órganos internos e hisopados de piel recolectados en ranas de vidrio en tres sitios del río Torres, en San José, Costa Rica, durante los años 2019-2022.

Tipo muestra	<i>H. fleischmanni</i>			<i>E. prosoblepon</i>			Agentes a analizar
	Sitio 1*	Sitio 2*	Sitio 3*	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	
Intestino	1	6	0	4	8	1	<i>Chlamydia</i> spp. y <i>Brucella</i> spp.
Hígado	1	6	0	4	8	1	<i>Ranavirus</i> , <i>Chlamydia</i> spp. y <i>Brucella</i> spp.
Hisopado 1	1	4	1	4	4	0	Bd
Hisopado 2	1	4	1	4	4	0	<i>Chlamydia</i> spp. y <i>Brucella</i> spp.

* **Sitios de estudio:** **Sitio 1:** Finca de la Municipalidad de La Unión de Tres Ríos (agua poco contaminada), **Sitio 2:** Parque del Este (agua medianamente contaminada) y **Sitio 3:** Guadalupe (agua muy contaminada).

2.3 Extracción de ADN de las muestras de ranas

Las 20 ranas fueron descongeladas y disectadas para obtener el hígado y los intestinos. Luego se realizó la extracción del ADN, tanto de los órganos, como de los hisopados 1 y 2 (Cuadro 1) con el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN, Venlo, Netherlands) según instrucciones del fabricante, y el material genético recuperado se conservó a -20°C hasta su análisis molecular. Se verificó y cuantificó la calidad del extracto de ADN procedente de los órganos e hisopados, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 v3.8; luego fueron sometidos a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de especies de Bd, RV-3, *Chlamydia* spp. y *Brucella* spp. (Cuadro 1).

2.4 Detección molecular de *B. dendrobatidis*

Los extractos de los hisopados 1 se analizaron mediante PCR en tiempo real (qPCR), amplificando el gen 5.8S y utilizando el protocolo descrito por Sreedharan et al. (2023) y Boyle et al. (2004) (Cuadro 2), se utilizaron dos controles positivos, uno para la detección de Bd por qPCR, proveniente de un plásmido con una secuencia de control positiva integrada para Bd y Bsal, separados por una secuencia de enlace corta, donado por el Laboratorio Estatal de Hesse (LHL) del Departamento de Diagnóstico Viroológico y Serológico de la Universidad de Hesse, Alemania; y el otro control positivo que se utilizó para PCR fue de una muestra positiva detectada con la qPCR. La mezcla que se realizó fue con las siguientes modificaciones: el volumen final de reacción fue de 25µL, incluyendo 12.5 µL de Sybr Green PCR Master Mix (2X), 0.8µL de cada iniciador (0.9mM), 5µL de ADN y 5.9µL de agua grado molecular. Las condiciones de ciclado fueron: 95°C por 10 minutos, con 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 62°C por 15 segundos. Muestras que resultaron positivas en el qPCR se analizaron mediante un PCR anidado, amplificando los genes 18S y 28S y siguiendo el protocolo descrito por Goka et al. (2009) (Cuadro 2), con las siguientes modificaciones: se utilizó un volumen final de reacción de 20µL, que incluyó 10µL de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X, 0.5µL de cada iniciador (10 mM), 2µL de ADN y 7µL de agua grado molecular. Las condiciones de ciclado para la primera ronda fueron: 94°C por 5 minutos, 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos y 72°C por 7 minutos, para la segunda ronda: 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto y 72°C por 7 minutos.

2.5 Detección molecular de *Ranavirus 3*

Los extractos de los hígados se analizaron mediante dos PCR convencionales que amplificaron el gen asociado a la proteína de la cápside mayor (MCP), comúnmente utilizado para la detección del virus (Tamukai et al., 2016), según los protocolos descritos por Ohlemeyer et al. (2011) y Goldberg et al. (2003) (Cuadro 2); se utilizó como control positivo un extracto de ADN de un cultivo de *Ranavirus 3* donado por el Laboratorio Estatal de Hesse (LHL) del Departamento de Diagnóstico Viroológico y Serológico de la Universidad de Hesse, Alemania. La mezcla se realizó con las siguientes modificaciones: volumen final de la reacción de 12.5µL, 6.25µL de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X, 0.5µL de cada iniciador

(10mM), 2.75µL de ADN y 2.5µL de agua grado molecular. Las condiciones de ciclado para el primer PCR fueron: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos a 93°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 40 segundos y 72°C por 5 minutos, y para el segundo PCR 94°C por 2 minutos, 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos y 72°C por 7 minutos.

2.6 Detección molecular de *Chlamydia* spp.

La detección inicial de *Chlamydia* spp. se realizó con los extractos de intestino, hígado e hisopados, utilizando un qPCR para amplificar un segmento del gen ARNr 23S (Everett et al., 1999, Cuadro 2) y se utilizó como control positivo un extracto de ADN del cultivo de la cepa patrón *C. muridarum* ATCC VR-123, donada por el Laboratorio de Chlamydias y Virus Papiloma Humano, Instituto de Virología, Facultad Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. La mezcla se realizó con un volumen final de reacción de 25µL, incluyendo 12.5 µL Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X), 1µL de cada iniciador (10mM), 0.5 µL de la sonda a concentración de 10 pmol/µL, 5µL de ADN y 5.5µL de agua grado molecular. Las condiciones de ciclado fueron: 95°C por 10 minutos, con 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 15 segundos. Las muestras que resultaron positivas en el qPCR se analizaron mediante un PCR convencional amplificando el gen ARNr 23S (Guo et al., 2016, Cuadro 2); con un volumen final de reacción de 25µL, que incluyó 12.5µL de Dream Taq™ PCR Master Mix (2X), 2.0µL de cada iniciador (10mM), 5µL de ADN y 3.5µL de agua grado molecular. Las condiciones de ciclado consistieron en 95°C por 3 minutos; 45 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, y 72°C por 5 minutos. Finalmente, para determinar la presencia de *Chlamydia pneumoniae* se realizaron dos PCR anidadas que amplificaron los genes *ompA* y *ropB*, siguiendo los protocolos de Bodetti et al. (2002) y Campbell et al. (1998); respectivamente (Cuadro 2). Las PCR anidadas se realizaron en un volumen final de reacción de 12.5µL, con 6.25µL de Dream Taq™ PCR Master Mix (2X), se agregó 1µL de cada iniciador (10mM), 2.25µL de agua grado molecular y 2.5µL de ADN. Las condiciones de ciclado del PCR para el gen *ompA* fue: 95°C por 5 minutos; 50 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, y 72°C por 5 minutos y para el PCR del gen *ropB* 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, y 72°C por 7 minutos.

2.7 Detección molecular de *Brucella* spp.

Los extractos de intestino, hígado e hisopados se analizaron mediante PCR anidado, amplificando el gen *omp25*, siguiendo el protocolo descrito por Buckle et al. (2017) (Cuadro 2), como control positivo se extrajo el ADN de una vacuna de *Brucella abortus* RB-51 donado por la Cooperativa Dos Pinos de Costa Rica. La mezcla se realizó con las siguientes modificaciones: se utilizó un volumen final de reacción de 12.5µL, que incluyó 6.25µL de Dream Taq™ PCR Master Mix (2X), 1µL de cada iniciador (10mM), 2µL de ADN y 2.25µL de agua grado molecular. Las condiciones de ciclado para la primera ronda fueron: 95°C a 15 minutos, 35 ciclos a 96°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minutos y 72°C por 5 minutos, para la segunda ronda: 95°C por 15 minutos, 30 ciclos de 96°C por 40 segundos, 65°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y 72°C por 5 minutos. Además, se amplificó el gen *Bcsp31* mediante PCR convencional como descrito por Satei et al. (2020). con las siguientes modificaciones: el volumen final de reacción fue de 20µL, incluyendo 10µL de Dream Taq™ PCR Master Mix (2X), 2µL de cada iniciador (10mM), 2.5µL de ADN y 3.5µL de agua grado molecular. Las condiciones de ciclado fueron: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 50 segundos, 60°C por 45 segundos, 72°C por 35 segundos y 72°C por 10 minutos.

2.8 Visualización de los productos amplificados y secuenciación

La visualización de los amplicones se realizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 50mL de amortiguador TBE 0.5x. La corrida de los geles se realizó en una cámara electroforética por 45-60 minutos a 100 voltios. Las muestras que amplificaron el tamaño de segmentos de ADN esperados (ver Cuadro 2) se consideraron positivos y se sometieron a purificación para ser enviados a secuenciación a MacroGen, Corea del Sur. Las secuencias fueron analizadas mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999) y comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank y la herramienta de análisis de ácidos nucleicos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Cuadro 2. Técnicas moleculares utilizadas para detectar Bd, RV-3, *Chlamydia* spp. y *Brucella* spp. en ranas de vidrio de la microcuenca del río Torres, San José, Costa Rica.

Agente infeccioso	Gen	Pares de bases	Nombre iniciador	Secuencia del iniciador (5'-3')	Método (Referencia)
<i>Bd</i>	5.8S	29 22	ITS1-3 Chytr 5.8S Chytr	CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA	qPCR (Sreedharan et al., 2023)
	18S 28S	500	Bd18SF1 Bd28SR1	TTTGTACACACCGCCCGTCCG ATATGCTTAAGTTCAGCGGG	PCR anidada (Goka et al., 2009)
	5.8S (regiones ITS1 e ITS2)	300	Bd1a Bd2a	CAGTGTGCCATATGTCACG CATGGTTCATATCTGTCCAG	
<i>RV-3</i>	Proteína de cápside mayor (MCP)	580	MCP1 F MCP1 R	CGCAGTCAAGGCCTTGATGT AAAGACCCGTTTTGCAGCAAAC	PCR (Ohlemeyer et al., 2011; OIE, 2019)
		500	MPC2 F (RANA OL T1) MPC2 R (RANA OL T2)	GACTTGGCCACTTATGAC GTCTCTGGAGAAGAAT	PCR (Goldberg et al., 2003; Mao et al., 1996)
<i>Chlamydia</i> spp.	ARNr 23S	132	TQF TQR TQS	GAAAAGAACCCTTGTTAAGGGAG CTTAACCTCCCTGGCTCATCATG FAM-CAAAAGGCACGCCGTCAAC-TAMRA	qPCR (Everett et al., 1999)
	ARNr 23S	329	23S-UP 23S-DN	GAGTCCGGGAGATAGACAGC CATGGATCTTCACTAGTATCCGC	PCR (Guo et al., 2016)
<i>C. pneumoniae</i>	<i>ompA</i>	419 279	Cpn5P Cpn3P Cpn5N Cpn3N	CCAATATGCACAGTCCAAACCTAAAA CTAGATTTAAACTTGTGATCTGACAG CTCTGTAAACAAACCGGGC GATCTGACAGGAAACAATTTGCAT	PCR anidada (Bodetti et al., 2002)
	<i>ropB</i>	437	HL1 (S) HR1 (A) N1 N2	GTTGTTTCATGAAGGCCTACT TGCATAACCTACGGTGTGTT AGTTGAGCATATTCGTGAGG TTTATTTCCGTGTCGTCCAG	PCR anidada (Campbell et al., 1998)
<i>Brucella</i> spp.	<i>omp25</i>	441	BC1 BC2	GTTGAAGTAGCTCCCCAGTA ACTGGGTGTAACGGTACTCA	PCR anidada (Buckle et al., 2017)
		271	Bcp1a Bcp3	AACTTCCAGAAGGACCAGATCGTA ATGTTGTCGGTCAGCTTGGCTTC	
	<i>bcs31</i>	223	B4 B5	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA CGCGCTTGCCCTTTCAGGTCTG	PCR (Satei et al., 2020)

3. Resultados

Las 20 ranas capturadas entre los años 2019 y 2021, así como las 14 ranas hisopadas en el año 2022 mostraron todos un EOG de 1 (bueno). Los machos y hembras de ambas especies

de ranas, tanto los capturados como los hisopados únicamente, no mostraron diferencias entre sexos respecto al ICC (machos: $U = 84$; $p > 0.05$; hembras: $U = 2$; $p > 0.05$), como se describe a continuación: el ICC de los machos de *H. fleischmanni* capturados fue de 5,8 (DE= 1,2; Max= 7,7; Min= 4,8), y los machos hisopados tuvieron un ICC similar de 5,6 (DE= 1,2; Max= 7,7; Min= 4,8); mientras que, la única hembra capturada obtuvo un ICC de 5 y las dos hembras hisopadas obtuvieron un ICC de 5,6.

De los 14 hisopados analizados para Bd, tres (21,4%) resultaron positivos en qPCR y PCR convencional (Cuadro 3). Dos (25%) de los ocho individuos del sitio 2 (un individuo *H. fleischmanni* y un individuo *E. prosoblepon*) y el único individuo *H. fleischmanni* capturado en el sitio 1, resultaron positivos a Bd. Las cinco muestras recolectadas en el sitio 3 resultaron negativas (Cuadro 3). La secuenciación confirmó el resultado, mostrando una similitud nucleotídica de 89% (225pb/253pb) con la secuencia MG252076 depositada en GenBank, aislada de varias especies de ranas de la región tropical de Asia.

Una muestra de hígado de *E. prosoblepon* recolectada en el año 2019 en el sitio 3 amplificó el segmento del gen MCP1 para RV-3 y una muestra de hígado de *H. fleischmanni* en el sitio 3 amplificó el segmento del gen MCP2 y también resultó positiva a *Chlamydia* spp. Los amplicones de ambas muestras se enviaron a secuenciar, pero no se obtuvo resultado.

El PCR en tiempo real para *Chlamydia* spp. arrojó resultados positivos en hisopados de dos ranas, el único individuo *H. fleischmanni* capturado en el sitio 1 en 2022, que también resultó positivo a Bd; y un individuo *E. prosoblepon* capturado en el sitio 3 en el mismo año que también resultó positivo a RV-3 (Cuadro 3). Las muestras amplificaron en el ciclo 32 y 35 del qPCR respectivamente. Además, por PCR y PCR anidada para *C. pneumoniae* resultaron positivos los hígados de dos *E. prosoblepon* en los sitios 2 y 3 capturados en el 2021 (Cuadro 3). Al analizar las muestras mediante PCR convencional sólo la muestra de hígado de *E. prosoblepon* del sitio 2 amplificó un segmento del gen *ompA*, sin embargo, no se logró confirmar el resultado mediante secuenciación.

Para *Brucella* spp. se amplificó un segmento del gen *Bcsp31* en seis individuos: en el sitio 2, el hígado e intestino de un individuo de *H. fleischmanni* capturado en el año 2019 y tres

intestinos de *E. prosoblepon* del 2021, mientras que, en el sitio 3 dos intestinos de *E. prosoblepon* capturados en el 2021 (Cuadro 3). La secuenciación de las muestras estableció la presencia de especies de *Achromobacter* únicamente en cinco muestras, no así la presencia de especies de *Brucella* (Cuadro 3), mostrando una similitud nucleotídica del 97% (218pb/224pb) comparadas con las secuencias CP065997, CP150896, CP065997 aisladas de la Cepa FDAARGOS_1050 de la Base de datos de la FDA para secuencias microbianas de grado regulatorio (FDA-ARGOS). Cuando se utilizó el PCR para amplificar el gen *omp25* no se obtuvieron resultados positivos. Ninguna de estas muestras resultó positiva a otro patógeno, por lo que no se tuvieron infecciones mixtas con este agente infeccioso.

Cuadro 3. Agentes infecciosos detectados en muestras de ranas de vidrio del río Torres, San José, Costa Rica.

Agente infeccioso	Especie rana	Tipo muestra	Sitio	Positivo/total (%)	Técnica molecular	Gen amplificado
<i>B. dendrobatidis</i>	<i>H. fleischmanni</i>	Hisopado 1	Finca Pizote	1/1 (100)	qPCR, PCR anidada	5.8S, 18S, 28S
	<i>H. fleischmanni</i> <i>E. prosoblepon</i>	Hisopado 1	Parque del Este	2/8 (25)		
<i>Ranavirus 3</i>	<i>H. fleischmanni</i>	Hígado	Guadalupe	1/1 (100)	PCR	MCP2
	<i>E. prosoblepon</i>	Hígado	Guadalupe	1/4 (25)		MCP1
<i>Chlamydia</i> spp. y <i>C. pneumoniae</i>	<i>H. fleischmanni</i>	Hisopado 1 y 2	Finca Pizote	1/1 (100)	qPCR	23S
	<i>H. fleischmanni</i> <i>E. prosoblepon</i>	Hisopado 2 Hígado	Parque del Este	2/8 (13)	qPCR PCR anidada	23S <i>ompA</i>
	<i>E. prosoblepon</i>	Hisopado 1 y 2 Hígado	Guadalupe	1/5 (20)	qPCR PCR	23S
				1/4 (25)		
<i>Achromobacter</i> spp.	<i>H. fleischmanni</i>	Hígado	Parque del Este	1/14 (7)	PCR	<i>Bcsp31</i>
	<i>E. prosoblepon</i>	Intestino		2/14 (14)		
	<i>E. prosoblepon</i>	Intestino	Guadalupe	2/5 (40)		

4. Discusión

El EOG y el ICC de los machos y de las hembras de *H. fleischmanni* y *E. prosoblepon* en los tres sitios se encontraron dentro de los parámetros normales. Los individuos estudiados no presentaron alteraciones físicas, ni problemas en la piel. Se esperaba encontrar diferencias físicas en las ranas al menos en el sitio con mayor contaminación hídrica, debido a un reporte previo, donde se evidenciaron diferencias en la contaminación microbiológica y química de los sitios (Trujillo-Acosta et al., 2017; Pérez-Gómez y Jiménez-Rocha, 2024). La importancia de calcular el EOG y el ICC en estos anuros radica en que, según Cohen, (2021)

la contaminación hídrica ocasiona malformaciones en las ranas y renacuajos; sin embargo, no se encontraron anomalías. Las razones pueden ser diversas, pero una de las más fuertes podría sugerir una adaptación a las condiciones estresantes de hábitats urbanos, donde las condiciones de contaminación y los eventos de intervención humana en el cauce del río son constantes (Villasenor et al., 2017; Sievers et al., 2019). En un futuro estudio se recomienda analizar la presencia de pesticidas como β -endosulfán y clorotalonil en el agua que producen bajo peso y retrasos en el desarrollo de los renacuajos (Ballesteros et al., 2024), así como medir los efectos ocasionados por la presencia de coliformes fecales que podrían generar infecciones sistémicas según Gray et al. (2007).

En la presente investigación se describe por primera vez la presencia de Bd en *H. fleischmanni* y en una nueva localización geográfica en un hábitat urbano, aumentando así a siete especies de ranas de vidrio costarricenses detectadas con Bd, en este caso se encontraron en Sabanilla y San Ramón de Tres Ríos. El hongo se encontró en un 21,4% (3/14) de individuos una cantidad mayor que lo encontrado en la Zona Protectora las Tablas, Puntarenas, donde se encontraron menos del 10% (22/363) de los *Atelopus varius* (Anura: Bufonidae) como infectados (de Vergara et al., 2022), concluyendo una baja afectación de esta población. Las ranas positivas a Bd se encontraron en los dos sitios más conservados y con menos porcentaje de coliformes fecales en el agua según reportes de Perez-Gomez y Jiménez-Rocha (2024).

Según explican Abarca et al. (2021) los anuros poseen en la piel una serie de bacterias favorables conocidas como microbiota, que puede variar la composición bacteriana entre especies de ranas y que, por tanto, les permite a unas especies de ranas ser más resistentes que otras ante exposiciones al hongo Bd, de hecho, algunas bacterias de la microbiota inhiben la acción del Bd. Además, de la composición de la microbiota, existen también unos péptidos producidos en la piel que también ayudan a inhibir la acción del hongo Bd (Woodhams et al., 2006; Abarca et al., 2021). Sin embargo, estos estudios se han realizado con ranas provenientes de zonas conservadas con baja exposición a contaminantes de origen urbano o en condiciones experimentales de laboratorios. Un estudio realizado en Costa Rica con doce especies de anuros, en diferentes localidades distribuidas por todo el país se determinó la

presencia de géneros bacterianos en la microbiota de los anuros inhibidores del Bd (Abarca et al., 2021).

En este trabajo se encontró el hongo en anuros saludables, lo que concuerda con la literatura, de que se trata de un hongo oportunista, por lo cual se dificulta controlarlo en ecosistemas naturales. Además, presenta variaciones genéticas, así la cepa Bd-GPL-2 que se ha encontrado en Costa Rica es más patógena y responsable de la extinción de ciertas especies de anuros a nivel mundial (Whitfield et al., 2013; Abarca et al., 2021), como las dos ranas de vidrio *Nymphargus balionotus* y *Centrolene geckoidea* que desaparecieron en zonas conservadas del Ecuador y fue atribuido al Bd (Guayasamin et al., 2020).

Según Woodhams et al. (2006) y Abarca et al. (2021) *E. prosoblepon* produce péptidos que son excretados a través de las glándulas mucosas de su piel que inhiben la acción del hongo Bd con gran éxito. Esta pareciera ser la razón del éxito de esta especie de rana ante la acción del Bd en un ambiente urbano, lo cual no se ha estudiado aún para *H. fleischmanni*. Se recomienda seguir realizando investigaciones en Costa Rica para estudiar el comportamiento de la cepa frente a las bacterias presentes en ambientes urbanos, así como la afectación de la microbiota y los péptidos producidos por las ranas de vidrio.

En esta investigación se reporta la presencia de *Ranavirus 3* en una nueva zona geográfica, (Guadalupe, Goicoechea), además es el primer hallazgo de RV-3 en *H. fleischmanni* y en *E. prosoblepon* en una zona urbana de Costa Rica (Whitfield et al., 2016; Whitfield et al., 2021). Aunque no se logró obtener la secuencia de las muestras positivas, los resultados están en concordancia con los hallazgos de RV-3 en *Teratohyla spinosa* en la Estación Biológica La Selva en Sarapiquí (Whitfield et al., 2013) y en *E. prosoblepon* en la Estación Biológica las Cruces en San Vito de Coto Brus en Puntarenas (Whitfield et al., 2021). Se recomienda para próximas investigaciones utilizar una técnica más sensible como el PCR en tiempo real y seguir intentando secuenciar las muestras positivas que se obtengan.

Chlamydia spp. se logró detectar por qPCR en cuatro individuos en los tres sitios de estudio, tanto en hisopados de piel como en órganos internos de *H. fleischmanni* y *E. prosoblepon*, lo que concuerda con otros estudios moleculares en anfibios donde también utilizaron qPCR

(gen *23S*) y PCR anidada (gen *ompA*) y detectaron la presencia de *Chlamydia* spp. en órganos internos (vesícula biliar, riñones, hígado, intestinos, corazón) y en la piel (Reed et al., 2000; Eisenberg et al., 2020). Hasta la fecha se han detectado cuatro especies y un nuevo género de *Chlamydia*: *Clamydia psittaci* (Mutschmann., 1998), *Chlamydia pneumoniae* (Bodetti et al., 2002; Vajana et al., 2018; Fratzke et al., 2019; Eisenberg et al., 2020), *Chlamydia abortus* y *Chlamydia suis* con métodos moleculares como qPCR y PCR anidada, y el nuevo género “*Amphibiichlamydia ranarum*” mediante un qPCR específico del gen 16S (Martel et al., 2013; Vejana et al., 2018). Aunque no se logró secuenciar una muestra que resultó positiva en la PCR anidada para el gen *ompA*, se recomienda seguir investigando la presencia de especies de *Chlamydia* en anuros de Costa Rica y descartar la presencia de *Similichlamydia*, *Neochlamydia*, *Protochlamydia* y *Parachlamydia* (Vejana et al., 2018).

El PCR amplificando el gen *Bcsp31* para *Brucella* spp., demostró ser inespecífico, ya que en cinco muestras de órganos de ambas especies de ranas de vidrio se determinó mediante secuenciación la presencia de la bacteria *Achromobacter* spp., lo que confirma lo reportado por Fischer et al. (2012) y Eisenberg et al. (2012) que mencionan que *B. inopinata* y *Achromobacter* spp. pueden ser identificadas erróneamente, por lo que recomiendan utilizar genes y regiones específicas: dentro del gen *Bcsp31* la región *IS711*, el gen 16S ARNr y los genes *omp2a* y *recA*, que al utilizar este conjunto de genes y regiones se consigue una identificación correcta. En nuestro caso utilizamos únicamente un gen específico (*Bcsp31*).

Un estudio desarrollado en Panamá con la rana de vidrio *H. colymbiophyllum* detectó *Achromobacter* spp., tanto en animales adultos como en los huevos (Hughey et al., 2017); sin embargo, se desconoce la importancia de esta bacteria, se cree que pertenece probablemente a la microbiota de la piel (Hughey et al., 2017). Otro estudio desarrollado en China con salamandras gigantes (*Andrias davidianus*) también llegó a la misma conclusión con *Achromobacter* spp. (Zhang et al., 2024).

Sin embargo, en el presente estudio se determinó la presencia de *Achromobacter* spp. en órganos internos (intestino e hígado), lo que podría deberse a una identificación errónea como ocurrió en la investigación desarrollada por Fischer et al. (2012) en donde se identificó la bacteria en la rana arbórea de ojos rojos inicialmente como una *Ochrobactrum anthropi*

(anteriormente conocida como *Achromobacter* spp.) y resultó ser una especie de *Brucella*, por lo que se recomienda seguir investigando la presencia de especies de *Brucella* en zonas urbanas.

Nuestros resultados concuerdan con Zhang et al. (2024) y Hughey et al. (2017), donde reportan que las ranas positivas a *Achromobacter* spp. no presentaron ningún agente infeccioso y se presentó sólo en ranas sanas. Se recomienda continuar con las investigaciones sobre la composición de la microbiota de las dos especies de ranas urbanas de Costa Rica, ya que ante los resultados de esta investigación y las de otros países se podría sugerir que esta bacteria sea parte de la microbiota normal de las ranas de vidrio *H. fleischmanni* y *E. prosoblepon*.

Se detectaron infecciones mixtas en dos ranas, *H. fleischmanni* presentó Bd y *Chlamydia* spp. y *E. prosoblepon* RV-3 y *Chlamydia* spp. Las interacciones entre agentes infecciosos, en especial con el Bd, son desfavorables para el sistema inmunológico del individuo y como se mencionó anteriormente, un desbalance en la microbiota o la producción de péptidos en la piel de la rana por acción de agentes infecciosos podría ocasionarle graves problemas de salud e incluso la muerte (Woodhams et al., 2006; Abarca et al., 2021).

Finalmente, la detección de agentes infecciosos en especies de ranas de vidrio urbanas es una temática poco investigada en la actualidad, es por esto que la importancia de fortalecer este tipo de iniciativas permitiría aumentar la información científica y generar nuevas líneas de investigación con patógenos zoonóticos existentes en zonas urbanas.

5. Conclusiones

- Se detectó por primera vez la presencia de Bd en *H. fleischmanni*, aumentando a siete especies de ranas de vidrio costarricenses positivas a Bd.
- Se detectó RV-3 en el hígado de *E. prosoblepon*, evidenciando la importancia de continuar la búsqueda de este patógeno en ambas especies de centrolénidos urbanos costarricenses.
- Se detectó por primera vez *Chlamydia* spp. tanto en *H. fleischmanni* como en *E. prosoblepon*.

- Se detectó por primera vez *Achromobacter* spp. en *H. fleischmanni* y *E. prosoblepon*.
- Todos los individuos (infectados y no infectados) mostraron un EOG e ICC dentro de los parámetros normales. Podría considerarse que sólo se trata de la detección de los agentes infecciosos y no de una infección que afecte dicha población; sin embargo, se requiere de más estudios con un mayor número de individuos que permita un mejor panorama de la salud de estas ranas de vidrio.

6. Recomendaciones

- Continuar realizando estudios para determinar la presencia y efecto de los agentes infecciosos en los anfibios costarricenses.
- Determinar si la cepa de Bd encontrada en el Parque del Este y San Ramón de Tres Ríos es patógena y si tiene relación con la cepa ya encontrada en el país.
- Estudiar la importancia de la cepa Bd en un ambiente contaminado con bacterias de origen urbano para determinar si existe afectación de la composición de la microbiota y producción de péptidos de *H. fleischmanni* y *E. prosoblepon*.
- Implementar una técnica más sensible como la PCR en tiempo real para detectar RV-3 y tratar de secuenciar RV-3 para confirmar los resultados.
- Confirmar la presencia de especies de *Chlamydia* y especies similares en anuros de Costa Rica, mediante la amplificación del gen 16S del ARNr o la región espaciadora del 16s-23s del ADNr.

7. Bibliografía

- Abarca, J. G., Whitfield, S. M., Zuniga-Chaves, I., Alvarado, G., Kerby, J., Murillo-Cruz, C., & Pinto-Tomás, A. A. (2021). Genotyping and differential bacterial inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* in threatened amphibians in Costa Rica. *Microbiology*, 167(3), 001017.
- AmphibiaWeb. 2024. <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Recuperado el 27 de febrero del 2024.

- Angeli, N. F., DiRenzo, G. V., Cunha, A., & Lips, K. R. (2015). Effects of density on spatial aggregation and habitat associations of the glass frog *Espadarana* (*Centrolene*) *prosoblepon*. *Journal of Herpetology*, 49(3), 388-394.
- Bancila, R. I., Hartel T., Plaiasu R., Smets J., & Cogalniceanu, D. (2010). Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. *Amphibia-Reptilia*, 31, 558-562.
- Basanta, M. D. (2019). Ecología y evolución de enfermedades emergentes en anfibios: una revisión de *Ranavirus* y quitridiomycosis. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 2(1), 9-25.
- Bodetti, T. J., Jacobson, E., Wan, C., Hafner, L., Pospischil, A., Rose, K., & Timms, P. (2002). Molecular evidence to support the expansion of the hostrange of *Chlamydomyces pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Systematic and applied microbiology*, 25(1), 146-152.
- Bosch, J. (2003). Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *Munibe*, 16, 56-73.
- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A. T., & Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of aquatic organisms*, 60(2), 141-148.
- Bravo, J., & Moreno, G. (2020). Quitridiomycosis en anfibios. *Bol. Soc. Micol*, 27-49.
- Buckle, K., Roe, W. D., Howe, L., Michael, S., Duignan, P. J., Burrows, E., ... & McDonald, W. L. (2017). Brucellosis in endangered Hector's dolphins (*Cephalorhynchus hectori*). *Veterinary pathology*, 54(5), 838-845.
- Burnard, D., & Polkinghorne, A. (2016). Chlamydial infections in wildlife-conservation threats and/or reservoirs of 'spill-over' infections? *Veterinary microbiology*, 196, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.018>.
- Campbell, L.A., Kuo, C.C. & Grayston, J.T. (1998). *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. *Emerg Infect Dis*. 4: 571-579.
- Cohen Jr, M. M. (2001). Frog decline, frog malformations, and a comparison of frog and human health. *American Journal of Medical Genetics*, 104(2), 101-109.
- de Vergara, R. S., Hoyos, D. A. G., Alvarado, G., Abarca, J. G., Estrella, J., Schipper, J., & Maya, J. F. G. (2022). Prevalencia del hongo quitridio en la “especie abanderada”

- Atelopus varius* (Anura, Bufonidae), Zona Protectora las Tablas, Costa Rica. UNED Research Journal, 14(S1), e3880-e3880.
- DiRenzo, G. V., Tunstall, T. S., Ibáñez, R., deVries, M. S., Longo, A. V., Zamudio, K. R., & Lips, K. R. (2018). External reinfection of a fungal pathogen does not contribute to pathogen growth. *EcoHealth*, 15(4), 815-826.
- Duffus, A. L., Waltzek, T. B., Stöhr, A. C., Allender, M. C., Gotesman, M., Whittington, R. J., ... & Marschang, R. E. (2015). Distribution and host range of ranaviruses. In *Ranaviruses* (pp. 9-57). Springer, Cham.
- Eisenberg, T., Fawzy, A., Kaim, U., Nessler, A., Riße, K., Völker, I., ... & Sting, R. (2020). Chronic wasting associated with *Chlamydia pneumoniae* in three ex situ breeding facilities for tropical frogs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113, 2139-2154.
- Eisenberg, T., Hamann, H. P., Kaim, U., Schlez, K., Seeger, H., Schauerte, N., ... & Zschöck, M. (2012). Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Applied and environmental microbiology*, 78(10), 3753-3755.
- Espinoza, C., & Villalta, R. (2004). Primera etapa del plan de manejo integral del recurso hídrico: la estrategia nacional para la GIRH en Costa Rica. Estudio de caso sobre la contaminación de la cuenca de los ríos Virilla y Grande de Tárcoles. San José, Costa Rica: Ministerio del Ambiente y Energía (MINAE).
- Everett, K.D., Hornung, L.H. & Andersen, A.A. (1999). Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 575-580.
- Ficht, T. (2010). *Brucella* taxonomy and evolution. *Future microbiology*, 5(6), 859-866. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.52>.
- Fischer, D., Lorenz, N., Heuser, W., Kämpfer, P., Scholz, H. C., & Lierz, M. (2012). Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(3), 625-628.
- Fratzke, A., Howard, L. L., Tociłowski, M. E., Armien, A., Oliveira, F., Ritchie, B., ... & Snook, E. (2019). *Chlamydia pneumoniae* polyoencephalomyelitis and ganglionitis in captive Houston toads (*Anaxyrus houstonensis*). *Veterinary pathology*, 56(5), 789-793.
- Garmyn, A., Van Rooij, P., Pasmans, F., Hellebuyck, T., Van Den Broeck, W., Haesebrouck, F., & Martel, A. (2012). Waterfowl: potential environmental reservoirs of the chytrid

- fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. PLoS one, 7(4), e35038.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035038>.
- Glabman, R. A., Thompson, K. A., Mani, R., Colburn, R., & Agnew, D. W. (2021). Atypical *Brucella inopinata*-Like Species in 2 Marine Toads. *Emerging Infectious Diseases*, 27(6), 1748.
- Guo, W., Li, J., Kaltenboeck, B., Gong, J., Fan, W., & Wang, C. (2016). *Chlamydia gallinacea*, not *C. psittaci*, is the endemic chlamydial species in chicken (*Gallus gallus*). *Scientific reports*, 6(1), 19638.
- Goka, K., Yokoyama, J. U. N., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., ... & Hyatt, A. D. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular ecology*, 18(23), 4757-4774.
- Goldberg, T. L., Coleman, D. A., Grant, E. C., Inendino, K. R., & Philipp, D. P. (2003). Strain variation in an emerging iridovirus of warm-water fishes. *Journal of virology*, 77(16), 8812-8818.
- Guayasamin, J. M., Cisneros-Heredia, D. F., McDiarmid, R. W., Peña, P., & Hutter, C. R. (2020). Glassfrogs of Ecuador: diversity, evolution, and conservation. *Diversity*, 12(6), 222.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95- 98.
- Holdridge, L. R. (1982). *Ecología basada en zonas de vida*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
- Hughey, M. C., Delia, J., & Belden, L. K. (2017). Diversity and stability of egg-bacterial assemblages: The role of paternal care in the glassfrog *Hyalinobatrachium colymbiphylum*. *Biotropica*, 49(6), 792-802.
- ICTV, Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (2024). Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. *Nucleic Acids Res.* 2017 Oct 13. PubMed PMID: 29040670.
<https://ictv.global/>
- Kimura, M., Une, Y., Suzuki, M., Park, E. S., Imaoka, K., & Morikawa, S. (2017). Isolation of *Brucella inopinata*-like bacteria from White's and Denny's tree frogs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(5), 297-302.

- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012). Virus Taxonomy, Family – Iridoviridae. Elsevier (193-210), ISBN 9780123846846.
- Kubicki, B. (2007). Ranas de vidrio de Costa Rica. Primera edición, Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Costa Rica.
- Küng, D., Bigler, L., Davis, L. R., Gratwicke, B., Griffith, E., & Woodhams, D. C. (2014). Stability of microbiota facilitated by host immune regulation: informing probiotic strategies to manage amphibian disease. PLoS One, 9(1), e87101.
- Levorse, A. (2018). Interactions between two key amphibian defenses to *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panamanian glass frogs (*Espadarana prosoblepon*).
- Martel, A., Adriaensen, C., Sharifian-Fard, M., Vandewoestyne, M., Deforce, D., Favoreel, H., ... & Pasmans, F. (2013). The novel ‘Candidatus *Amphibiichlamydia ranarum*’ is highly prevalent in invasive exotic bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). Environmental Microbiology Reports, 5(1), 105-108.
- Mitura, A., Niemczuk, K., Zaręba, K., Zajac, M., Laroucau, K., & Szymańska-Czerwińska, M. (2017). Free-living and captive turtles and tortoises as carriers of new *Chlamydia* spp. PloS one, 12(9), e0185407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185407>.
- Mutschmann, F. (1998). Nachweis von *Chlamydia psittaci*-Infektionen bei amphibiern mittels eines spezifischen Immunofluoreszenztests [Detection of *Chlamydia psittaci* infections in amphibians using an immunofluorescence test]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 111(5):187-9. German. PMID: 9639956.
- Ohlemeyer, S., Holopainen, R., Tapiovaara, H., Bergmann, S. M., & Schütze, H. (2011). Major capsid protein gene sequence analysis of the Santee-Cooper ranaviruses DFV, GV6, and LMBV. Diseases of aquatic organisms, 96(3), 195-207.
- OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal). (2021). RANAVIRUSES Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control Potential Impacts of Disease Agent Beyond Clinical Illness References. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/ranavirusesinfection-with.pdf>
- Oram, B. (2013). Online Calculator for Determining a Water Quality Index. Dallas, United States of America: National Sanitation Foundation (NSF). Recuperado de <http://www.water-research.net/index.php/water-treatment/water-monitoring/monitoring-the-quality-of-surfacewaters>

- Pérez-Gómez, G., Jiménez-Rocha, A. E. & T, Bermúdez-Rojas. (2018). Parásitos gastrointestinales de aves silvestres en un ecosistema urbano tropical en Heredia, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 66 (2): 788-798p.
- Pérez-Gómez, G., & Jiménez-Rocha, A. E. (2024). Parásitos gastrointestinales zoonóticos y no zoonóticos en ranas de un río urbano tropical de Costa Rica. *UNED Research Journal*, 16, e4803-e4803.
- Rebollar, E. A., Hughey, M. C., Medina, D., Harris, R. N., Ibáñez, R., & Belden, L. K. (2016). Skin bacterial diversity of Panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *The ISME journal*, 10(7), 1682-1695.
- Reed, K. D., Ruth, G. R., Meyer, J. A., & Shukla, S. K. (2000). *Chlamydia pneumoniae* infection in a breeding colony of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Emerging Infectious Diseases*, 6(2), 196.
- Rojas-Morales, J. A., Castro-Gómez, A., & Escobar-Lasso, S. (2014). Joyas de los Andes tropicales: Colombia tierra de Ranas de Cristal. *Bioma*, 19(2), 1-38.
- Satei, E., Mirshahabi, H., Zeighami, H., Gholoobi, A., & Sadeghi, H. (2020). Molecular survey of BCSP31 and IS711 using PCR assays in detection of *Brucella* spp. in raw milk. *Meta Gene*, 24, 100683.
- Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A. A., Burrowes, P. A., Carvalho, T., Catenazzi, A., De la Riva, I., Fisher, M. C., Flechas, S. V., Foster, C. N., Frías-Álvarez, P., Garner, T. W. J., Gratwicke, B., Guayasamin, J. M., Hirschfeld, M., ... Canessa, S. (2019). Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434), 1459-1463. <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>.
- Sievers, M., Hale, R., Swearer, S. E., & Parris, K. M. (2019). Frog occupancy of polluted wetlands in urban landscapes. *Conservation Biology*, 33(2), 389-402.
- Sreedharan, G., Singh Panwar, Y., Murthy, S., Klop-Toker, K., Ibáñez, R., Illueca, E. E., ... & Vasudevan, K. (2023). A Universal and Efficient Detection of Chytridiomycosis Infections in Amphibians Using Novel Quantitative PCR Markers. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2023, 1-9.
- Tamukai, K., Tokiwa, T., Kobayashi, H., & Une, Y. (2016). Ranavirus in an outbreak of dermatophilosis in captive inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *Veterinary dermatology*, 27(2), 99-e28.

- Trujillo-Acosta, A., Peraza-Estrella, M. J., Marina-Hipólito, J. G., & Boraschi, S. F. (2017). Evaluación del Corredor Interurbano Río Torres, Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 14(34), 53-62.
- Velásquez, B. E., Castro, F., Bolívar, W., & Herrera, M. I. (2007). Infection by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in anurans from Cordillera Occidental in Colombia. *Herpetotropicos: Tropical Amphibians & Reptiles*, 4(2), 65-71.
- Vajana E, Widmer I, Rochat E, Duruz S, Selmoni O, Vuilleumier S, Aeby S, Greub G, Joost S. (2018) Indication of spatially random occurrence of *Chlamydia*-like organisms in *Bufo bufo* tadpoles from ponds located in the Geneva metropolitan area. *New Microbes New Infect*; 27:54-63. doi: 10.1016/j.nmni.2018.11.006. PMID: 30622711; PMCID: PMC6307092.
- Villasenor, N. R., Driscoll, D. A., Gibbons, P., Calhoun, A. J., & Lindenmayer, D. B. (2017). The relative importance of aquatic and terrestrial variables for frogs in an urbanizing landscape: Key insights for sustainable urban development. *Landscape and Urban Planning*, 157, 26-35.
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R., & Skerratt, L. F. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of aquatic organisms*, 77(2), 113-118. <https://doi.org/10.3354/dao01838>.
- Vredenburg, V. T., & Briggs, C. (2007). Chytrid Swab Protocol. http://amphibiaweb.org/chytrid/swab_instruction_Spanish_2009.pdf.
- Walke, J. B., Harris, R. N., Reinert, L. K., Rollins-Smith, L. A., & Woodhams, D. C. (2011). Social immunity in amphibians: evidence for vertical transmission of innate defenses. *Biotropica*, 43(4), 396-400.
- Whitfield, S. M., Alvarado-Barboza, G., Abarca, J. G., Zumbado-Ulate, H., Jiménez, R. R., & Kerby, J. (2021). Ranavirus is widespread in Costa Rica and co-occurs with threatened amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms*, 144, 89-98.
- Whitfield, S. M., Geerdes, E., Chacon, I., Rodriguez, E. B., Jimenez, R. R., Donnelly, M. A., & Kerby, J. L. (2013). Infection and co-infection by the amphibian chytrid fungus and ranavirus in wild Costa Rican frogs. *Diseases of aquatic organisms*, 104(2), 173-178.

- Whitfield, S. M., Lips, K. R., & Donnelly, M. A. (2016). Amphibian decline and conservation in Central America. *Copeia*, 104(2), 351-379.
- Woodhams, D. C., Voyles, J., Lips, K. R., Carey, C., & Rollins-Smith, L. A. (2006). Predicted disease susceptibility in a Panamanian amphibian assemblage based on skin peptide defenses. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(2), 207-218.
- Zhang, H., Ma, H., Jiang, W., Deng, J., Yuan, J., Fang, C., ... & Wang, Q. (2024). Bacterial community analysis of the skin microbiota of cultured Chinese giant salamander infected with Ranavirus. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1356161.
- Zumbado-Ulate, H., Nelson, K. N., García-Rodríguez, A., Chaves, G., Arias, E., Bolaños, F., ... & Searle, C. L. (2019). Endemic infection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Costa Rica: Implications for amphibian conservation at regional and species level. *Diversity*, 11(8), 129.

Artículo II

Efectos de la calidad del agua sobre el desarrollo de los renacuajos de *Espadarana prosoblepon* (Anura: Centrolenidae)

Resumen

Espadarana prosoblepon es una de 15 especies de ranas de vidrio de Costa Rica que vive en ríos urbanos expuesto a contaminación por desechos orgánicos, industriales, farmacológicos, agropecuarios y pesticidas, entre otros. El presente estudio pretendió determinar el efecto de la contaminación del agua sobre el crecimiento y desarrollo de los renacuajos de *E. prosoblepon* así como detectar en éstos la presencia de agentes infecciosos. Se recolectaron masas de huevos de *E. prosoblepon* y se colocaron en cuatro terrarios con agua de tres sitios diferentes del río Torres (T1: Finca Pizote, T2: Parque del Este y T3: Guadalupe) y T4: con agua destilada como control. Los renacuajos se observaron por cuatro meses, determinando cada dos días el comportamiento, movimientos de natación, alimentación, supervivencia, longitud, coloración y estado de desarrollo de Gosner. Los huevos se analizaron molecularmente para determinar la presencia del hongo quitridio, *Ranavirus 3* y especies de bacterias de *Chlamydia* y *Brucella*. Al iniciar el estudio se realizó un análisis de los parámetros fisicoquímico y microbiológico del agua de los tres sitios. Se determinó diferencia significativa entre los tratamientos con respecto a la duración de la salida de los renacuajos del agua ($H = 13,12$; $gl = 3$; $p = 0,0044$). Así los renacuajos del T1 y T4 duraron más días en llegar a metamorfosis con respecto al T3 y T2 ($HSD = 10,05$; $p < .05$ y $HSD = 12,46$; $p < .05$ respectivamente). Los terrarios T1 y T4 fueron en los que se estableció mayor supervivencia de los huevos hasta metamorfosis, además se determinó la mayor duración en días de los renacuajos en el agua hasta iniciar la etapa terrestre. Cinco de los parámetros medidos en el agua (saturación oxígeno, sólidos sedimentables totales, coliformes fecales, demanda bioquímica de oxígeno y fosfatos) se encontraron fuera de los límites establecidos para aguas superficiales en los tres sitios de muestreo, siendo los coliformes fecales el parámetro más desigual (para T1, T2, y T3: 712 N.M.P/mL, 6870 N.M.P/mL y 24196 N.M.P/mL, respectivamente). El ICA-NSF clasificó el agua utilizada en T1 y T2 como aguas con mediana calidad, mientras que el agua del T3 resultó de mala calidad. No se detectaron agentes infecciosos en las masas de huevos, a excepción de una especie de bacteria *Achromobacter*. Se recomienda continuar investigando el efecto de los coliformes fecales

sobre los renacuajos *E. prosoblepon* y repetir estos experimentos utilizando mayor cantidad de huevos. Además, es importante establecer si *Achromobacter* es parte de la microbiota la piel de las ranas de vidrio urbanas.

Palabras clave

Rana de vidrio, contaminación hídrica, río Torres, *Achromobacter* spp., metamorfosis.

Abstract

Espadarana prosoblepon is one of 15 species of glass frogs from Costa Rica that lives in urban rivers exposed to contamination by organic, industrial, pharmacological, agricultural and pesticide waste, among others. The present study aimed to determine the effect of water contamination on the growth and development of *E. prosoblepon* tadpoles, as well as to detect the presence of infectious agents in them. Egg masses of *E. prosoblepon* were collected and placed in four terrariums with water from three different sites of the Torres River (T1: Finca Pizote, water with few microbiological and chemical contaminants; T2: Parque del Este, water moderately contaminated with fecal coliforms; T3: Guadalupe, water pollution high with unpleasant odors; and T4, distilled water as a control. The tadpoles were observed for four months, determining every two days the behavior, swimming movements, feeding, survival, length, coloration, and Gosner developmental status. In addition, the eggs were molecularly analyzed to determine the presence of the chytrid fungus, *Ranavirus* 3, and *Chlamydia* and *Brucella* species. At the beginning of the study, an analysis of the physicochemical and microbiological parameters of the water at the three sites was carried out. A significant difference was determined between the treatments concerning the duration of the tadpoles leaving the water ($H = 13.12$; $df = 3$; $p = 0.0044$). Thus, the tadpoles from T1 and T4 took more days to reach metamorphosis compared to T3 and T2 ($HSD = 10.05$; $p < .05$ and $HSD = 12.46$; $p < .05$ respectively). In the T1 and T4 terrariums the greatest survival of tadpoles was established, in addition, the longest duration in days of the tadpoles in the water, until starting the terrestrial stage, was determined. Five of the parameters measured in the water (oxygen saturation, total settleable solids, fecal coliforms, biochemical oxygen demand, and phosphates) were found outside the limits established for surface waters at the three sampling sites, with fecal coliforms being the most important unequal parameter (for T1, T2, and T3: 712 N.M.P/mL, 6870 N.M.P/mL and 24196 N.M.P/mL, respectively). The

ICA-NSF classified the water used in T1 and T2 as medium quality, while the water in T3 was of poor quality. No infectious agents were detected in the egg masses, except for *Achromobacter* spp. It is recommended to continue investigating the effect of fecal coliforms on *E. prosoblepon* tadpoles and to repeat these experiments using a larger number of eggs. Furthermore, it is important to establish whether *Achromobacter* is part of the skin microbiota of urban glass frogs.

Keywords

Glass frog, water pollution, Torres River, *Achromobacter* spp., metamorphosis.

1. Introducción

Espadarana prosoblepon o rana de vidrio Esmeralda es una de 15 especies de ranas de vidrio de Costa Rica, y se encuentra distribuida en Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia y Ecuador (Rojas-Morales et al., 2014; Basto-Riascos et al., 2017; AmphibiaWeb, 2024). En Costa Rica se encuentra en todo el país, excepto en algunas partes de Guanacaste y la península de Nicoya. Se distribuye a una altitud de 0 a 1900 m.s.n.m (Kubicki, 2007). Esta rana pertenece a la familia Centrolenidae, de tamaño mediano, las hembras tienen una longitud de hocico-cloaca de 25 a 31mm y los machos entre 23 a 28mm, en la región ventral se observan al menos tres cuartas partes cubiertas por peritoneo parietal blanco, mientras que los órganos poseen una cubierta visceral translúcida; sus huesos en vida se observan color azul-verdoso (Kubicki, 2007; Basto-Riascos et al., 2017).

El ciclo de vida de los anuros inicia con la puesta de huevos sobre las hojas, una vez que estos culminan su desarrollo caen al agua como renacuajos, y en esta etapa es en la que están más expuestos a contaminantes en el río (Boyer y Grue, 1995; Demichelis et al., 2001). La rana de vidrio Esmeralda (*E. prosoblepon*) coloca sus huevos en el haz de las hojas, con posturas entre 20 y 45 huevos (Kubicki, 2007; Basto-Riascos et al., 2017), la coloración de los renacuajos en sus primeras etapas es de tono café y los de mayor tamaño se van tornando rojizos (Kubicki, 2007).

El tamaño, la supervivencia y la metamorfosis de los renacuajos de *E. prosoblepon* se ven afectados directamente por las variaciones en la temperatura del agua, por ejemplo, a

temperaturas más altas (25-30°C) se producen metamorfosis más tardadas y los metamorfos serán de tamaño más pequeño (longitud hocico-cloaca) (Bernal-Bautista y Villa-Navarro, 2017).

En ambientes urbanos las fuentes de agua se han encontrado contaminadas con desechos orgánicos, agrícolas e industriales, pesticidas (Klemens et al., 2003; Ghose et al., 2014; Méndez et al., 2016; Ballesteros et al., 2024; IUCN SSC Amphibian Specialist Group, 2024), y desechos farmacológicos, como lo son los medicamentos. Éstos llegan al agua al ser vertidos al río por medio de la orina humana o animal y afectan directamente la fauna acuática (macroinvertebrados, peces, anfibios, reptiles, aves), provocando efectos adversos (Croteau et al., 2008; Moreno-Ortiz et al., 2013) como, retrasos en la metamorfosis o crecimiento de renacuajos por contacto con la tiroxina, finalmente retrasos en el desarrollo de extremidades en renacuajos después de estar expuestos a antidepresivos (Teixeira, 2013).

En un estudio realizado en Ohio, Estados Unidos por Smith et al. (2005) expusieron a los renacuajos del sapo americano (*Anaxyrus americanus*) a concentraciones de acetaminofén, cafeína y triclosán, observando una mortalidad alta y temprana debido al acetaminofén o paracetamol, y una actividad disminuida y mortalidad temprana debido al triclosán, mientras que la cafeína no tuvo efectos adversos sobre los renacuajos.

La presencia de pesticidas en los ríos de California, Estados Unidos, evidenció también signos de estrés en los renacuajos, ya que presentaron altos niveles de acetilcolinesterasa en músculos, ocasionando una supresión del sistema inmunológico, y haciendo a las ranas más propensas a enfermedades infecciosas (Santos et al., 2015).

Otros investigadores en Canadá determinaron aumentos en el coeficiente de variación del tamaño del genoma a través del uso de citometría de flujo por exposición de ranas a organofosforados producto de la agricultura, ocasionando altas tasas de mortalidad y malformaciones en adultos (Hall y Henry, 1992).

En Australia se determinó que la mayor afectación para la supervivencia de cinco especies de ranas no era la exposición constante a contaminantes sino la disponibilidad de vegetación

cercana al humedal. Una expansión urbana desproporcionada y sin planificación que ocasione una reducción de su hábitat para refugio y reproducción puede provocar una supervivencia disminuida en los anuros (Sievers et al. 2019).

En Costa Rica se han desarrollado varios estudios experimentales con renacuajos expuestos a diversos contaminantes, como la investigación desarrollada por Ghose et al. (2014) en la Estación Biológica La Selva en Sarapiquí. Ahí se trabajó con masas de huevos y desarrollo de renacuajos de la especie *Agalychnis callidryas*, a los que se expusieron experimentalmente a los 10 tipos de pesticidas más comunes de Costa Rica, estableciendo que todos los pesticidas mostraron efectos negativos en el crecimiento y cambios comportamentales de los renacuajos.

Uno de los estudios más recientes desarrollado por Ballesteros et al. (2024) se llevó a cabo en San Rafael de Heredia, donde se utilizaron renacuajos de la especie *Lithobates taylori* que fueron sometidos a tres factores de estrés: depredadores, concentraciones de β -endosulfán y concentraciones de clorotalonil, mostrando efectos del β -endosulfán (bajo peso), mientras que los renacuajos expuestos al clorotalonil mostraron retrasos en las mediciones de tamaño durante el desarrollo de los renacuajos.

La contaminación orgánica y la alteración de los parámetros fisicoquímicos del agua en ríos urbanos ocasiona pH bajos (6,5 – 8), alta eutrofización (turbidez <25) (La Gaceta, 2007), poco oxígeno disuelto (<6) (Arce-Villalobos et al., 2022) y altos niveles de amonio o amoniaco (propio de ambientes agrícolas y urbanos), inhibiendo el desarrollo embrionario, debido a un desbalance iónico que provoca malformaciones, crecimiento reducido o tasas bajas de sobrevivencia (Boyer & Grue, 1995).

El río Torres, ubicado en la provincia de San José, Costa Rica, nace en el distrito de Rancho Redondo y desemboca en el río Virilla, sector La Carpio. Es considerado uno de los ríos más contaminados de la capital, porque se encuentra rodeado de asentamientos humanos, centros de salud, fincas ganaderas y agropecuarias, así como zonas industriales, que en su mayoría presentan un mal manejo de aguas residuales, descargando constantemente contaminantes orgánicos y químicos en sus aguas (Trujillo-Acosta et al., 2017). Esta contaminación

ambiental y la presencia de agentes infecciosos antrópicos podrían estar afectando el desarrollo y la salud de las ranas (Montalvão et al., 2018; Kubicki, 2007; Rojas-Morales et al., 2014).

Es por lo que este trabajo pretende investigar el efecto de la contaminación hídrica del Río Torres sobre el crecimiento y desarrollo de los renacuajos de *E. prosoblepon*.

2. Materiales y métodos

2.1 Tipo de estudio:

Se realizó un estudio experimental en el que se recolectaron masas de huevos de *E. prosoblepon* que fueron llevadas al laboratorio. Estas masas se colocaron en cuatro terrarios de vidrio con condiciones ambientales controladas, similares a las de su hábitat natural (temperatura de 22°C y humedad relativa entre 65-80%). Cuando los huevos eclosionaron se llenaron los terrarios con agua de cada uno de los tres sitios de estudio y uno con agua destilada como control. Los sitios seleccionados en el río Torres de los cuales se obtuvo el agua para cada tratamiento, se ubicaron en la parte alta de la microcuenca (un sitio) y en la parte media de la microcuenca (dos sitios) que difirieron con relación al nivel de contaminación hídrica, disponibilidad de vegetación cercana al río y expansión de zonas urbanas.

El primer sitio se ubicó en la Finca de la Municipalidad de la Unión de Tres Ríos (Finca Pizote), rodeado de bosque secundario maduro y nacientes de varias quebradas, sitio en el que se esperaba una condición más natural del agua o con poco aporte de aguas servidas, debido a que presentaba poca expansión del parche urbano (Trujillo-Acosta et al., 2017). El segundo sitio correspondió al Parque del Este, perteneciente al cantón de Sabanilla, un espacio en el que se conservan relictos de bosque secundario en regeneración y se considera como “pulmón verde del cantón de Montes de Oca”, permitiendo albergar gran cantidad de flora y fauna urbana; la quebrada que atraviesa el Parque (quebrada del Este) y desemboca en el río Torres presenta una contaminación orgánica incipiente por estar rodeada de un parche urbano más extenso que el sitio anterior (Trujillo-Acosta et al., 2017). Finalmente, el tercer sitio se ubicó en Guadalupe en la urbanización El Roblar, una zona con alto porcentaje urbano, con vegetación a orillas del río como parte de la zona protectora; sin embargo, la

contaminación por desechos sólidos y aporte de aguas servidas es la más evidente de los sitios, ya que se percibieron olores desagradables del agua y se observaron gran cantidad de desechos sólidos (Trujillo-Acosta et al., 2017) (Figura 1).

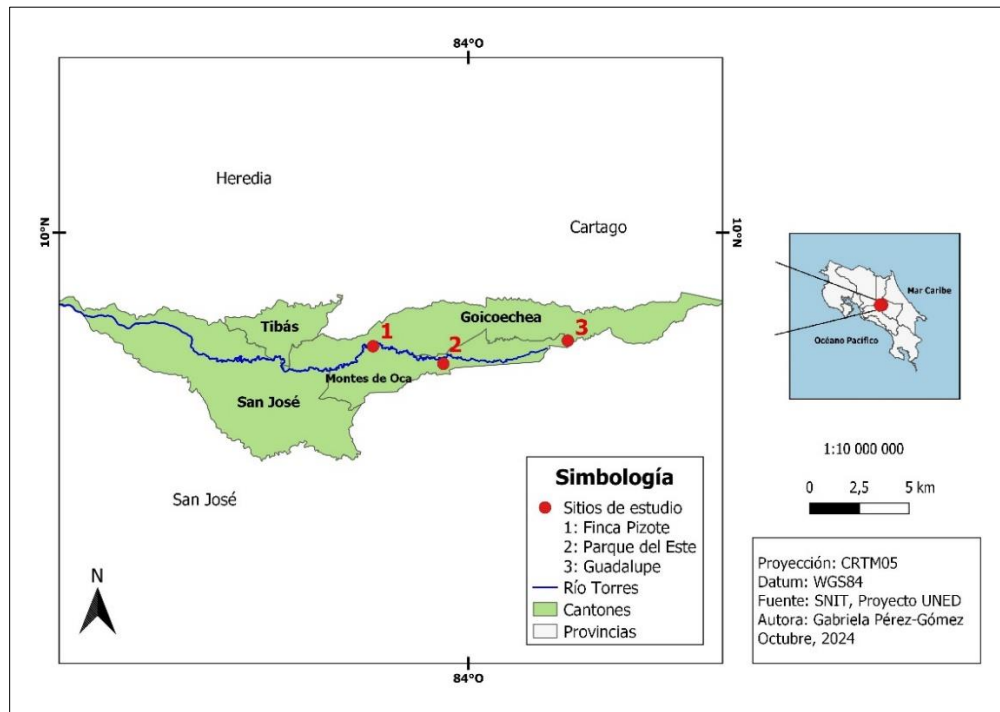


Figura 1. Sitios de recolecta de agua para la crianza de renacuajos de *E. prosoblepon* en la microcuenca del río Torres, San José, Costa Rica. 1: Finca Pizote, 2: Parque del Este, 3: Guadalupe.

2.2. Descripción del estudio experimental

La recolecta de los huevos de *E. prosoblepon* se realizó durante toda la época lluviosa (mayo a octubre 2023) en el Parque del Este. Se obtuvieron cuatro masas de huevos de *E. prosoblepon* para un total de 80 huevos (Cuadro 2) en estadio de desarrollo de 15 a 21 según Gosner, (1960) (Figura 2). Cada masa de huevos se colocó en un terrario y se evaluó el desarrollo de los renacuajos, con diferentes tipos de agua. En el terrario 1 (T1) se colocó agua proveniente del sitio 1, en el T2 agua del sitio 2, en el T3 agua del sitio 3 y en el T4 agua destilada.

El agua cubrió $\frac{2}{3}$ de los terrarios y se cambió cada cuatro días, sacando $\frac{1}{3}$ partes de agua del terrario e introduciendo $\frac{1}{3}$ de agua fresca de cada sitio. Esta agua fue recolectada en

cada sitio de estudio dos veces por semana y preservada en refrigeración para evitar procesos de descomposición adicionales. Además, en cada terrario se utilizó un oxigenador mecánico de pecera para mantener el movimiento y la oxigenación mecánica. Cada dos días se realizaron observaciones de los renacuajos en cada acuario durante cuatro meses y se registró lo siguiente: 1. estado de desarrollo de los huevos según Gosner (1960) lo cual fue medido utilizando la Figura 2, 2. Número de renacuajos vivos y muertos, 3. Longitud total de los renacuajos (cola y cuerpo), 4. Coloración, 5. Comportamiento, 6. Movimientos de natación (regulares o irregulares), 7. Alimentación.

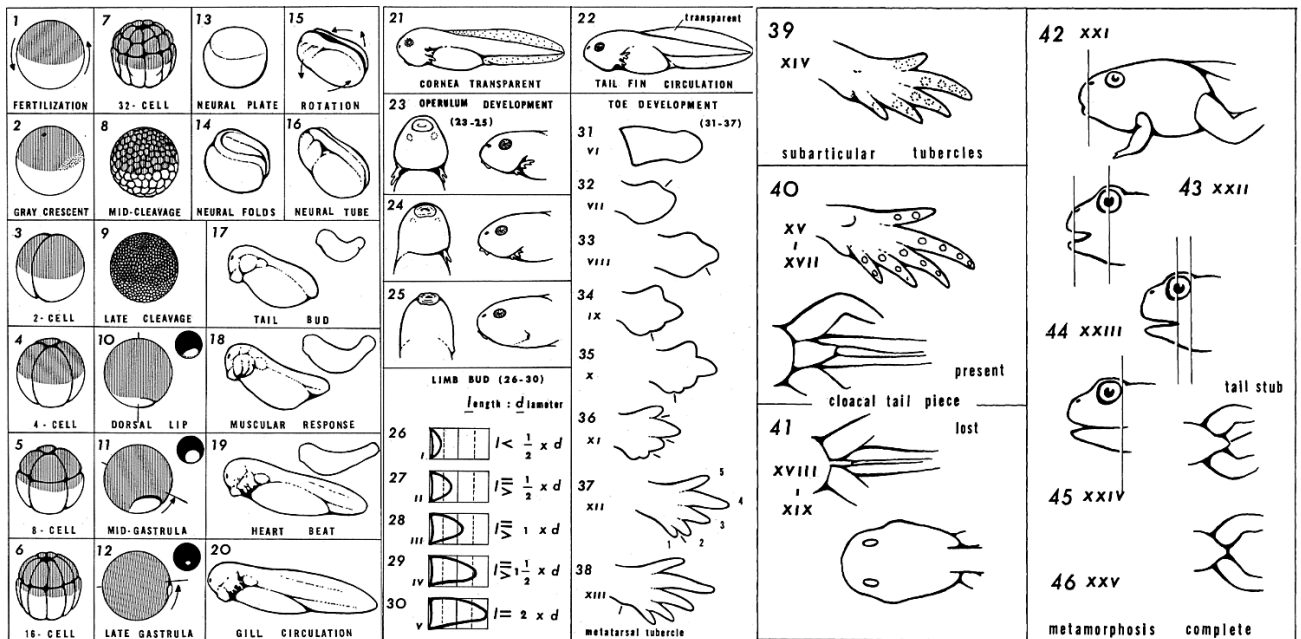


Figura 2. Descripción de la clasificación de los estadios larvales según Gosner (1960).

Estas observaciones siguieron siempre el mismo orden para evitar contaminación cruzada entre terrarios, de la siguiente forma: revisión de renacuajos en T4 (control), T1 (Finca Pizote), T2 (Parque del Este) y T3 (Guadalupe). Al finalizar las revisiones de cada tratamiento se desinfectó cada instrumento y durante todo el proceso de medición se utilizaron guantes y mascarilla. Además, se realizaron lavados semanales de los terrarios con agua, cloro y jabón para cristalería. Al finalizar el lavado de los terrarios se vertió agua caliente para eliminar los restos de los productos de desinfección utilizados. Durante los cuatro meses de revisión de los acuarios se retiraban los renacuajos que iban muriendo.

2.3. Análisis fisicoquímicos y microbiológicos del agua

Al inicio del experimento se realizaron los análisis fisicoquímicos y microbiológicos del agua de los sitios 1, 2 y 3, determinando los siguientes parámetros con el uso de un medidor multiparamétrico Hanna Instruments HI98194: turbidez (NTU), temperatura (°C), conductividad (mS/cm), sólidos disueltos totales (SDT, mg/L) oxígeno disuelto (OD, mg/L), porcentaje de saturación de oxígeno (PSO, %) y pH. Además, se enviaron muestras a un laboratorio certificado para determinar el número de coliformes fecales (NMP/100mL); nitratos (mg/L), fosfatos (mg/L); demanda bioquímica de oxígeno (DBO, mg/L); y así completar los parámetros necesarios para aplicar el Índice de Calidad de Aguas (ICA) de la Fundación Nacional de Sanidad (NSF por sus siglas en inglés) (Oram, 2013). La toma de muestras se realizó siguiendo el protocolo del “Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales” (RECAAS) (La Gaceta, 2007; Pérez-Gómez et al., 2021). Finalmente, basado en los desechos orgánicos e inorgánicos calculados, se utilizó el índice de calidad del agua ICA-NSF (Oram, 2013) para la clasificación del agua.

2.4. Análisis moleculares de las masas de huevos

De cada masa de huevos se separaron 2 a 3 huevos que se sometieron a análisis moleculares para determinar la presencia de *B. dendrobatidis* (Bd), *Ranavirus 3* (RV-3), *Chlamydia* spp. y *Brucella* spp., utilizando los protocolos descritos en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real (qPCR) utilizadas para detectar agentes infecciosos en los huevos de *E. prosoblepon* (Anura: Centrolenidae) en la microcuenca del río Torres, San José, Costa Rica.

Agente infeccioso	Gen	Segmento de ADN (pb)	Nombre iniciador	Secuencia del iniciador (5'-3')	Método (Referencia)
<i>Bd</i>	5.8S	29 22	ITS1-3 Chytr 5.8S Chytr	CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC AGCCAAGAGATCCGTTGTCAA	qPCR (Sreedharan et al., 2023)
<i>Ranavirus 3</i>	Proteína de cápside mayor (MCP)	580	MCP1 F MCP1 R	CGCAGTCAAGGCCTTGATGT AAAGACCCGTTTTGCAGCAAAC	PCR (Ohlemeyer et al., 2011; OIE, 2019)

Agente infeccioso	Gen	Segmento de ADN (pb)	Nombre iniciador	Secuencia del iniciador (5'-3')	Método (Referencia)
<i>Bd</i>	5.8S	29 22	ITS1-3 Chytr 5.8S Chytr	CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA	qPCR (Sreedharan et al., 2023)
<i>Chlamydia spp.</i>	ARNr 23S	132	TQF TQR TQS	GAAAAGAACCCTTGTTAAGGGAG CTTAACCTCCCTGGCTCATCATG FAM-CAAAAGGCACGCCGTCAAC-TAMRA	qPCR (Everett et al., 1999)
<i>Brucella spp.</i>	<i>Bcsp31</i>	223	B4 B5	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA CGCGCTTGCCCTTCAGGTCTG	PCR (Satei et al., 2020)

2.5. Permisos de investigación

Para esta investigación se contó con permisos de investigación de la Comisión Nacional de Biodiversidad (CONAGEBIO) y el Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC), resolución: R-044-2023- OT-CONAGEBIO.

2.6 Análisis estadístico

Se estimó el porcentaje de supervivencia en cada tratamiento contabilizando la cantidad de metamorfos multiplicado por 100 y dividido entre la cantidad de huevos colocados en cada terrario. Para comparar la duración (en días) de salida de los renacuajos y el tamaño de los renacuajos en los cuatro tratamientos se utilizó una prueba de Kruskal Wallis (H). Para verificar si existieron diferencias de esas dos variables entre los tratamientos se utilizó una prueba de ANOVA de una sola vía (HSD). Las pruebas estadísticas se realizaron mediante el complemento para Microsoft Excel denominado XLStatistics (Carr, 2017).

3. Resultados

En el T1 eclosionaron los 12 huevos, llegando a metamorfosis nueve con una (75,0% supervivencia). En el T2 se colocaron 23 huevos, eclosionaron 20 y llegaron a metamorfos 12 individuos (52,2% supervivencia). En el T3 se colocaron 20 huevos, eclosionaron 14 y llegaron a metamorfos 11 individuos (55,0% supervivencia). En el T4 eclosionaron todos los 15 huevos y llegaron a metamorfos 13 individuos (86,7% supervivencia) (Cuadro 2).

Se encontró diferencia significativa entre los tratamientos con respecto al promedio de la duración de salida del agua de los renacuajos ($H = 13,12$; $gl = 3$; $p = 0,0044$; $gl = 3$). Así los renacuajos del T1 y T4 duraron más días en llegar a metamorfosis con respecto al T3 y T2 ($HSD = 10,05$; $p < .05$ y $HSD = 12,46$; $p < .05$; $gl = 3$ respectivamente). No se determinó diferencia significativa entre los cuatro tratamientos de agua con respecto al promedio del tamaño de los renacuajos (Kruskal-Wallis $H = 13,12$; $gl = 3$; $p = 1$; $gl = 3$).

Cuadro 2. Descripción del desarrollo larval de cuatro masas de huevos de *Espadarana prosoblepon* (Anura: Centrolenidae) en cuatro tratamientos de agua con diferentes niveles de contaminación hídrica.

Terrario	Estadio Gosner*	Huevos eclosionados/Total (%)	Metamórfos/Total (%)	Días para eclosión (min-max)	Días para Metamorfosis (min-max)
T1	21	12/12 (100)	9/12 (75,0)	5 – 9	81 – 119
T2	20	20/23 (86,9)	12/23 (52,2)	5 – 14	85 – 119
T3	15	14/20 (70,0)	11/20 (55,0)	10 – 16	78 – 97
T4	20	15/15 (100)	13/15 (86,7)	3 – 11	81 – 103

* **Estadio de Gosner de los huevos al inicio del experimento (día 0).** **T1:** Terrario con agua del río Torres a la altura de la Finca de la Municipalidad de La Unión de Tres Ríos, Pizote, **T2:** Terrario con agua del Parque del Este. **T3:** Terrario con agua de Guadalupe, y **T4:** Terrario con agua destilada.

En el Cuadro 3 se muestran los resultados de la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua proveniente de los tres sitios de investigación utilizados en los terrarios 1, 2 y 3. Cinco de los parámetros medidos en el agua (saturación oxígeno [%], sólidos sedimentables totales [SST], coliformes fecales, demanda bioquímica de oxígeno [DBO] y fosfatos) se encontraron fuera de los límites establecidos para aguas superficiales en los tres sitios de muestreo. Además, los coliformes fecales medidos en el agua de los tres sitios fue el parámetro que más varió (para T1, T2 y T3 712 N.M.P/mL, 6870 N.M.P/mL y 24196 N.M.P/mL, respectivamente), sobrepasando los límites normales en los tres sitios.

El ICA-NSF clasificó el agua utilizada en T1 y T2 como aguas con mediana calidad, mientras que el agua del T3 resultó de mala calidad (Cuadro 3). Según el Reglamento de Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales N° 33903-MINAE-S de Costa Rica (RECAAS), el agua utilizada en T1 y T2 se clasificaron como clase 4 y el T3

como clase 5, ambas clasificaciones sugieren ser aguas no utilizables para actividades humanas ni para mantener el equilibrio natural de las comunidades acuáticas.

Cuadro 3. Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua de los tres sitios de estudio del río Torres de San José, Costa Rica; utilizados en los terrarios T1, T2 y T3.

Parámetro	T1	T2	T3	Valores normales	Referencia
Oxígeno disuelto (mg/L)	6,11	6,64	6,00	6-10	Arce-Villalobos et al., 2022
Saturación Oxígeno (%)	78,20	83,20	74,40	91-100	
Temperatura (°C)	16,57	17,49	19,21	Natural o según el sitio	
pH	7,06	6,98	7,11	6,5-8,5	
SST (mg/L)	79,00	100,0	119,0	< 10	La Gaceta, 2007
Coliformes fecales (N.M.P/mL)	712	6870	24196	< 20	
Turbidez (NTU)	3,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2	12 ± 0,2	< 25	
DBO (mg/L)	<4,0	<4,0	7,2 ± 0,4	< = 3	
Nitratos (mg/L)	1,2 ± 0,5	11 ± 0,5	10 ± 0,5	< 5	
Fosfatos (mg/L)	<1,0	1,8 ± 0,1	2,13 ± 0,1	< 0,01	OMS, 2022
Puntuación del ICA-NSF	64	55	49	90-100	Oram, 2013
Clasificación del ICA-NSF	Medio	Medio	Mala	Excelente	
MINAE (RECAAS)	Clase 4	Clase 4	Clase 5	Clase 1	La Gaceta, 2007

Los análisis moleculares de las cuatro masas de huevos de *E. prosoblepon* resultaron negativos a *B. dendrobatidis*, *Ranavirus 3*, *Chlamydia* spp. y *Brucella* spp. En un caso se detectó mediante PCR convencional la amplificación del gen *Bcsp3I* donde la secuenciación determinó la presencia de *Achromobacter* en la masa de huevos colocada en el terrario T1, mostrando una similitud nucleotídica de 75% (60pb/80pb), comparada con la secuencia LT707065.1 MFA1 R4 del ensamblaje del genoma, cromosoma: I, depositado directamente en Lawrence Berkeley National Laboratory, California, EE.UU.

4. Discusión

El efecto de la contaminación de los ríos urbanos sobre el desarrollo y la sobrevivencia de los anfibios que habitan en ellos se ha estudiado poco (Sievers et al., 2019; Dunán et al., 2021); sin embargo, es importante, pues la piel de los anuros es altamente permeable y sensible, haciéndolos vulnerables a los contaminantes en el agua (Boyer y Grue, 1995; Demichelis et al., 2001). Es en las zonas urbanas donde los contaminantes exhiben una mayor

concentración y variabilidad, incluyendo: grandes cantidades de materia orgánica, fertilizantes, agroquímicos, desechos farmacológicos e industriales, hidrocarburos, pesticidas, entre otros (Croteau et al., 2008; Basanta, 2019; Cuzziol et al., 2024). Por ejemplo, un desecho común de las industrias son los metales pesados como el aluminio y el zinc (Dunán et al., 2021), que han demostrado ser perjudiciales para los renacuajos provocando alteraciones en el peso, malformaciones en el aparato bucal e intestino y afectaciones a las células inmunológicas: linfocitos, leucocitos y neutrófilos (de Albuquerque et al., 2024).

Teniendo en cuenta el hábitat en el que estas ranas de vidrio se desarrollan surgió la necesidad de entender la influencia o posibles efectos de estos contaminantes sobre el desarrollo de los renacuajos de estas ranas. Se identificó que el promedio de desarrollo embrionario de los huevos de las ranas de vidrio puede durar hasta 17 días (Kubicki, 2007), lo cual concuerda con el período de la duración de eclosión de este estudio, por esto fue importante determinar el estadio de Gosner al inicio del experimento, ya que a partir del desarrollo inicial se puede medir el tiempo restante para la salida de las larvas. El T3 tuvo el estadio de Gosner más inmaduro (estadio 15) respecto a los demás tratamientos (Cuadro 2), pero se logró comprobar que la duración de eclosión es proporcional con el estadio, ya que fue la que más duró en eclosionar por completo (de 10 a 16 días), concordando así con el desarrollo embrionario normal de las ranas de vidrio según Kubicki (2007).

Los tratamientos T1 y T4 fueron en los que se estableció mayor supervivencia de los huevos hasta metamorfosis, además se determinó la mayor duración en días en el agua hasta iniciar la etapa terrestre. Esto podría deberse a que los niveles de la contaminación microbiológica y fisicoquímica del agua fue menor respecto al agua de los tratamientos T2 y T3 donde la supervivencia fue mucho menor y la metamorfosis más acelerada, presentando seis de los diez parámetros fisicoquímicos y microbiológicos más elevados y fuera de los límites sugeridos para ríos de Costa Rica (La Gaceta, 2007; Arce-Villalobos et al., 2022; OMS, 2022). Esto concuerda con lo mencionado por Ballesteros et al. (2024), quienes observaron que la contaminación o el estrés pueden acelerar la metamorfosis de los renacuajos haciendo que salgan más pronto del agua para estar menos tiempo expuestos a estas condiciones ambientales desfavorables.

A pesar de las condiciones aceleradas de metamorfosis obtenidas en T2 y T3, no se presentaron diferencias significativas respecto al tamaño (longitud total), coloración, comportamiento, movimientos de natación, ni alimentación de los renacuajos entre los tratamientos, esto puede deberse a que la muestra no fuera representativa para determinar efectos morfológicos o comportamentales, por lo que se recomienda repetir este experimento con una mayor cantidad de muestras. Aunque la temperatura del agua en los recintos fue menor (16° y 19°C) que la reportada para la crianza de renacuajos en cautiverio (25°-26°C), esto parece no haber afectado el metabolismo de los renacuajos, su desarrollo morfológico, ni la velocidad de metamorfosis (Borges et al., 2014).

En este estudio, los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua confirmaron la contaminación del río Torres en los tres sitios de investigación, determinándose no aptas para mantener el equilibrio natural de las comunidades acuáticas (Demichelis et al., 2001; Borges et al., 2014). Cinco de los parámetros medidos en el agua (PSO, SST, coliformes fecales, DBO y fosfatos) se encontraron fuera de los límites establecidos. Sin embargo, la gran ventaja de los ríos es que sus aguas constantemente fluyen y cambian su condición fisicoquímica y microbiológica continuamente, esta ventaja permitió probablemente la presencia del oxígeno mecánico, incorporado al agua por el movimiento constante de la corriente (Pérez-Castillo y Rodríguez, 2008), aun así, el porcentaje de saturación de oxígeno se mostró inferior a los límites normales. Por el contrario, el DBO superó los límites normales (Cuadro 3), lo que puede deberse al aumento en las actividades de descomposición de materia orgánica aportada por las altas cantidades de coliformes fecales detectados en los tres sitios y nutrientes en exceso como el fosfato medido (Demichelis et al., 2001). Estas condiciones de contaminación afectaron la velocidad de metamorfosis y la supervivencia, debido a que dificultó que los renacuajos tuvieran las condiciones óptimas que si tuvieron en el tratamiento control (T1), donde estos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos se mantuvieron constantes y dentro de los límites normales.

La contaminación fecal medida al inicio del estudio mostró diferencias marcadas en la cantidad de coliformes fecales (*Escherichia coli*) en cada sitio, lo que pudo haber influido en el tiempo de metamorfosis y en la mortalidad de renacuajos, aunque esto ha sido poco estudiado hasta la fecha. Una investigación realizada en Tennessee, Estados Unidos, sugirió

la posibilidad, que metamorfos de la rana toro (*Rana catesbeiana*) eliminaran la *E. coli* ingerida como renacuajos; sin embargo, esto afectó el sistema inmunológico y sufrieron infecciones sistémicas en etapa de metamorfos (Gray et al., 2007). Se recomienda realizar más estudios para establecer si los coliformes fecales afectan a los renacuajos de la rana *E. prosoblepon* o cualquier otra especie de rana de vidrio.

Finalmente, se detectó la presencia de *Achromobacter* spp. en huevos del T1, esta bacteria ha sido reportada en huevos y adultos de la rana de vidrio *Hyalinobatrachium colymbiophyllum* en un estudio realizado en Panamá (Hughey y Belden, 2017). Se cree que podrían ser parte de la flora bacteriana normal y tener una función de protección contra patógenos en adultos y huevos (Hughey y Belden, 2017). Se requiere de más investigación para comprobar que esta bacteria sea parte de su microbiota o un agente infeccioso. No se detectó la presencia de Bd, *Chlamydia* spp., *Brucella* spp. ni *Ranavirus* 3 en los huevos recolectados. En el caso de la ausencia de Bd podría deberse a dos razones principales: 1- este hongo requiere queratina para poder desarrollarse y los huevos no poseen queratina, 2- poseen una capa gelatinosa que impide que el hongo colonice los embriones (OIE, 2019). En cuanto al *Ranavirus* 3, se sabe que puede causar la muerte de embriones y larvas después de varios días de la inoculación del virus en el individuo (Rakesh y Granoff, 1999). La no detección de *Chlamydia* al igual que los agentes anteriores podría deberse también al tamaño de muestra, quizá al realizarlo en mayor cantidad de masas de huevos y tomar la muestra *in situ*, podría arrojar otros resultados.

5. Conclusiones

- Se determinó diferencia significativa entre los tratamientos con respecto a la duración de la salida de los renacuajos del agua. Así los renacuajos del T1 y T4 duraron más días en llegar a metamorfosis con respecto al T3 y T2.
- Los terrarios T1 y T4 fueron en los que se estableció mayor supervivencia de los huevos hasta metamorfos, además, se determinó la mayor duración en días de los renacuajos en el agua hasta iniciar la etapa terrestre.
- No se determinaron diferencias con respecto al tamaño (longitud total), coloración, comportamiento, movimientos de natación ni alimentación en ninguno de los tratamientos.

- En los tres sitios de estudio se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos y microbiológicos alterados: saturación oxígeno, sólidos sedimentables totales, coliformes fecales, demanda bioquímica de oxígeno y fosfatos.
- Los sitios 2 y 3 presentaron mayor cantidad de coliformes fecales en el agua y eventualmente esto afectó la supervivencia y mortalidad de los renacuajos criados en los tratamientos con agua proveniente de esos sitios.
- Los índices de calidad de agua, tanto el NSF como el RECAAS determinaron la calidad del agua del sitio 1 y 2 como media y la del sitio 3 como mala.
- Se detectó *Achromobacter* spp. en los huevos de *E. prosoblepon*, no se detectó Bd, *Chlamydia* spp., *Brucella* spp. ni *Ranavirus* 3.

6. Recomendaciones

- Aumentar los esfuerzos de investigación experimental en renacuajos de diferentes especies de ranas de vidrio para detectar los efectos de los coliformes fecales.
- Realizar investigación sobre la microbiota en ranas de vidrio.
- Realizar este experimento con una mayor cantidad de huevos y hacer recombinación de huevos para aumentar la variabilidad genética en el experimento.
- Aumentar los monitoreos urbanos en anuros urbanos para identificar las necesidades ambientales como: conservación del hábitat y mejora sanitaria respecto al manejo de aguas negras y desechos sólidos.

7. Bibliografía

- AmphibiaWeb. (2024). <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Recuperado el 27 de febrero del 2024.
- Arce-Villalobos, K., Sánchez-Gutiérrez, R., Centeno-Morales, J., Marín-León, R., & Rodríguez-Rodríguez, J. A. (2022). Calidad del agua superficial y presiones socioambientales en la microcuenca alta del río Poás. *Uniciencia*, 36(1), 382-404.
- Ballesteros, E., Bolaños, F., Ruepert, C., Jiménez, R., Bonilla, F., & Sasa, M. (2024). Immunological and physiological responses to predation risk and sublethal concentrations of chlorothalonil and β -endosulfan in *Lithobates taylori* (Anura: Ranidae) tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 107071.

- Basto-Riascos, M. C., López-Caro, J., & Londoño-Guarnizo, C. A. (2017). *Espadarana prosoblepon*. *Anfibios y Reptiles*, 52.
- Borges, F. D. F., Stéfani, M. V. D., & Amaral, L. A. D. (2014). Quality of the effluents of bullfrog tadpole ponds. *Boletim do instituto de pesca*, 409-417.
- Boyer, R., & Grue, C. E. (1995). The need for water quality criteria for frogs. *Environmental health perspectives*, 103(4), 352-357.
- Carr, R (2017). XLStatistics: Excel workbooks for statistical analysis. Version 17-02-16. <https://www.deakin.edu.au/individuals-sites/?request=~rodneyc/XLStatistics.r>
- Croteau, M. C., Hogan, N., Gibson, J. C., Lean, D., & Trudeau, V. L. (2008). Toxicological threats to amphibians and reptiles in urban environments. *Urban Herpetology*, 3, 197-209.
- Cuzziol Boccioni, A. P., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Leiva, L., Colussi, C. L., Repetti, M. R., ... & Lajmanovich, R. C. (2024). High toxicity of agro-industrial wastewater on aquatic fauna of a South American stream: Mortality of aquatic turtles and amphibian tadpoles as bioindicators of environmental health. *Water Environment Research*, 96(3), e11010.
- Demichelis, S. O., De La Torre, F. R., Ferrari, L., Garcia, M. E., & Salibian, A. (2001). Tadpoles assay: Its application to a water toxicity assessment of a polluted urban river. *Environmental monitoring and assessment*, 68, 63-73.
- Dunán Ávila, P. L., Fernández Rodríguez, M., Riverón Zaldívar, A. B., & Bassas Noa, P. R. (2021). Evaluación del contenido de metales pesados en las aguas del Río Yamanigüey.
- de Albuquerque, V. J., Folador, A., Müller, C., Pompermaier, A., Hartmann, M., & Hartmann, P. A. (2024). How do different concentrations of aluminum and zinc affect the survival, body size, morphology and immune system of *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826) tadpole?. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 1-15.
- Everett, K.D., Hornung, L.H. & Andersen, A.A. (1999). Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 575-580.

- Ghose, S., M. A. Donnelly, J. L. Kerby, & S. M. Whitfield. (2014). Acute toxicity tests and metaanalysis identify gaps in tropical ecotoxicology for amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(9): 2114-2119.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.
- Gray, M. J., Rajeev, S., Miller, D. L., Schmutzer, A. C., Burton, E. C., Rogers, E. D., & Hickling, G. J. (2007). Preliminary evidence that American bullfrogs (*Rana catesbeiana*) are suitable hosts for *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 4066-4068.
- Hall, R. J., & Henry, P. F. (1992). Assessing effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs. *Herpetological Journal* 2(3), 65-71.
- Hughey, M. C., Delia, J., & Belden, L. K. (2017). Diversity and stability of egg-bacterial assemblages: The role of paternal care in the glassfrog *Hyalinobatrachium colymbiphylum*. *Biotropica*, 49(6), 792-802.
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2024). Amphibian conservation action plan: A status review and roadmap for global amphibian conservation. Wren, S., Borzée, A., Marcec-Greaves, R. & Angulo, A. (Eds.). IUCN SSC Occasional Paper, No 57. Gland, Switzerland: IUCN.
- Klemens, J. A., Wieland, M. L., Flanagan, V. J., Frick, J. A., & Harper, R. G. (2003). A cross-taxa survey of organochlorine pesticide contamination in a Costa Rican wildland. *Environmental pollution*, 122(2), 245-251.
- Kubicki, B. (2007). *Ranas de vidrio de Costa Rica*. Primera edición, Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Costa Rica.
- La Gaceta. (2007). *Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpo de Agua Superficiales N° 33903-MINAE-S*. San José, Costa Rica: Imprenta Nacional.
- Méndez, M., Obando, P., Pinnock-Branford, M., Ruepert, C., Castillo, L. E., Mena, F., & Alvarado, G. (2016). Acute, chronic and biochemical effects of chlorothalonil on *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* and *Smilisca baudinii* tadpoles. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 21238-21248.
- Montalvão, M. F., da Silva Castro, A. L., de Lima Rodrigues, A. S., de Oliveira Mendes, B., & Malafaia, G. (2018). Impacts of tannery effluent on development and

- morphological characters in a neotropical tadpole. *Science of the Total Environment*, 610, 1595-1606.
- Moreno-Ortiz, Victor Cesar, Martínez-Núñez, Juan Manuel, Kravzov-Jinich, Jaime, Pérez-Hernández, Luis Alberto, Moreno-Bonett, Consuelo, & Altagracia-Martínez, Marina. (2013). Los medicamentos de receta de origen sintético y su impacto en el medio ambiente. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(4), 17-29. Recuperado en 05 de septiembre de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000400003&lng=es&tlng=es.
- OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal). (2019). Infection with Ranavirus. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/current/chapitre_ranavirus.pdf
- OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal). (2021). RANAVIRUSES Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control Potential Impacts of Disease Agent Beyond Clinical Illness References. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/ranavirusesinfection-with.pdf>
- Organización Mundial de la Salud-OMS. (2022). Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Oram, B. (2013). Online Calculator for Determining a Water Quality Index. Dallas, United States of America: National Sanitation Foundation (NSF). Recuperado de <http://www.water-research.net/index.php/water-treatment/water-monitoring/monitoring-the-quality-of-surfacewaters>
- Ohlemeyer, S., Holopainen, R., Tapiovaara, H., Bergmann, S. M., & Schütze, H. (2011). Major capsid protein gene sequence analysis of the Santee-Cooper ranaviruses DFV, GV6, and LMBV. *Diseases of aquatic organisms*, 96(3), 195-207.
- Pérez-Castillo, A. G., & Rodríguez, A. (2008). Índice fisicoquímico de la calidad de agua para el manejo de lagunas tropicales de inundación. *Revista de Biología tropical*, 56(4), 1905-1918.
- Pérez-Gómez, G., Alvarado-García, V., Rodríguez-Rodríguez, J. A., Herrera, F., & Sánchez-Gutiérrez, R. (2021). Calidad fisicoquímica y microbiológica del agua superficial del

- río Grande de Tárcoles, Costa Rica: un enfoque ecológico. UNED Research Journal, 13(1), 69-86. <https://doi.org/10.22458/urj.v13i1.3148>
- Pérez-Gómez, G., Jiménez-Rocha, A. E. & T, Bermúdez-Rojas. (2018). Parásitos gastrointestinales de aves silvestres en un ecosistema urbano tropical en Heredia, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 66 (2): 788-798p.
- Rojas-Morales, J. A., Castro-Gómez, A., & Escobar-Lasso, S. (2014). Joyas de los Andes tropicales: Colombia tierra de Ranas de Cristal. *Bioma*, 19(2), 1-38.
- Rakesh M. Goorha y Allan Granoff. (1999). FROG VIRUS 3 (IRIDOVIRIDAE). EN: *Encyclopedia of Virology (Second Edition)*. Ed: Allan Granoff y Robert G. Webster. Elsevier, Ámsterdam, Países Bajos. 582-587. ISBN 9780122270307, <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0105>.
- Santos, T. G., Melo, R., Costa-Silva, D. G., Nunes, M. E. M., Rodrigues, N. R., & Franco, J. L. (2015). Assessment of water pollution in the Brazilian Pampa biome by means of stress biomarkers in tadpoles of the leaf frog *Phyllomedusa iheringii* (Anura: Hylidae). *PeerJ*, 3, e1016.
- Satei, E., Mirshahabi, H., Zeighami, H., Gholoobi, A., & Sadeghi, H. (2020). Molecular survey of BCSP31 and IS711 using PCR assays in detection of *Brucella* spp. in raw milk. *Meta Gene*, 24, 100683.
- Sievers, M., Hale, R., Swearer, S. E., & Parris, K. M. (2019). Frog occupancy of polluted wetlands in urban landscapes. *Conservation Biology*, 33(2), 389-402.
- Smith, G. R., & Burgett, A. A. (2005). Effects of three organic wastewater contaminants on American toad, *Bufo americanus*, tadpoles. *Ecotoxicology*, 14, 477-482.
- Sreedharan, G., Singh Panwar, Y., Murthy, S., Klop-Toker, K., Ibáñez, R., Illueca, E. E., ... & Vasudevan, K. (2023). A Universal and Efficient Detection of Chytridiomycosis Infections in Amphibians Using Novel Quantitative PCR Markers. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2023, 1-9.
- Teixeira, M. Z. (2013). La evidencia científica del modelo epistemológico homeopático. *Homeopatía Méx*, 82(685), 5-20.
- Trujillo-Acosta, A., Peraza-Estrella, M. J., Marina-Hipólito, J. G., & Boraschi, S. F. (2017). Evaluación del Corredor Interurbano Río Torres, Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 14(34), 53-62.

Discusión general

El EOG y el ICC de los machos y de las hembras de *H. fleischmanni* y *E. prosoblepon* en los tres sitios se encontraron dentro de los parámetros normales. Los individuos estudiados no presentaron alteraciones físicas, ni problemas en la piel. Se esperaba encontrar diferencias físicas en las ranas al menos en el sitio con mayor contaminación hídrica, debido a un reporte previo, donde se evidenciaron diferencias en la contaminación microbiológica y química de los sitios (Trujillo-Acosta et al., 2017; Pérez-Gómez y Jiménez-Rocha, 2024). La importancia de calcular el EOG y el ICC en estos anuros radica en que, según Cohen, (2021) la contaminación hídrica ocasiona malformaciones en las ranas y renacuajos; sin embargo, no se encontraron anomalías. Las razones pueden ser diversas, pero una de las más fuertes podría sugerir una adaptación a las condiciones estresantes de hábitats urbanos, donde las condiciones de contaminación y los eventos de intervención humana en el cauce del río son constantes (Villasenor et al., 2017; Sievers et al., 2019). En un futuro estudio se recomienda analizar la presencia de pesticidas como β -endosulfán y clorotalonil en el agua que producen bajo peso y retrasos en el desarrollo de los renacuajos (Ballesteros et al., 2024), así como medir los efectos ocasionados por la presencia de coliformes fecales que podrían generar infecciones sistémicas según Gray et al. (2007).

En la presente investigación se describe por primera vez la presencia de Bd en *H. fleischmanni* y en una nueva localización geográfica en un hábitat urbano, aumentando así a siete especies de ranas de vidrio costarricenses detectadas con Bd, en este caso se encontraron en Sabanilla y San Ramón de Tres Ríos. El hongo se encontró en un 21,4% (3/14) de individuos una cantidad mayor que lo encontrado en la Zona Protectora las Tablas, Puntarenas, donde se encontraron menos del 10% (22/363) de los *Atelopus varius* (Anura: Bufonidae) como infectados (de Vergara et al., 2022), concluyendo una baja afectación de esta población. Las ranas positivas a Bd se encontraron en los dos sitios más conservados y con menos porcentaje de coliformes fecales en el agua según reportes de Pérez-Gómez y Jiménez-Rocha (2024).

Según explican Abarca et al. (2021) los anuros poseen en la piel una serie de bacterias favorables conocidas como microbiota, que puede variar la composición bacteriana entre

especies de ranas y que, por tanto, les permite a unas especies de ranas ser más resistentes que otras ante exposiciones al hongo Bd, de hecho, algunas bacterias de la microbiota inhiben la acción del Bd. Además, de la composición de la microbiota, existen también unos péptidos producidos en la piel que también ayudan a inhibir la acción del hongo Bd (Woodhams et al., 2006; Abarca et al., 2021). Sin embargo, estos estudios se han realizado con ranas provenientes de zonas conservadas con baja exposición a contaminantes de origen urbano o en condiciones experimentales de laboratorios. Un estudio realizado en Costa Rica con doce especies de anuros, en diferentes localidades distribuidas por todo el país se determinó la presencia de géneros bacterianos en la microbiota de los anuros inhibidores del Bd (Abarca et al., 2021).

En este trabajo se encontró el hongo en anuros saludables, lo que concuerda con la literatura, de que se trata de un hongo oportunista, por lo cual se dificulta controlarlo en ecosistemas naturales. Además, presenta variaciones genéticas, así la cepa Bd-GPL-2 que se ha encontrado en Costa Rica es más patógena y responsable de la extinción de ciertas especies de anuros a nivel mundial (Whitfield et al., 2013; Abarca et al., 2021), como las dos ranas de vidrio *Nymphargus balionotus* y *Centrolene geckoidea* que desaparecieron en zonas conservadas del Ecuador y fue atribuido al Bd (Guayasamin et al., 2020).

Según Woodhams et al. (2006) y Abarca et al. (2021) *E. prosoblepon* produce péptidos que son excretados a través de las glándulas mucosas de su piel que inhiben la acción del hongo Bd con gran éxito. Esta pareciera ser la razón del éxito de esta especie de rana ante la acción del Bd en un ambiente urbano, lo cual no se ha estudiado aún para *H. fleischmanni*. Se recomienda seguir realizando investigaciones en Costa Rica para estudiar el comportamiento de la cepa frente a las bacterias presentes en ambientes urbanos, así como la afectación de la microbiota y los péptidos producidos por las ranas de vidrio.

En esta investigación se reporta la presencia de *Ranavirus 3* en una nueva zona geográfica, (Guadalupe, Goicoechea), además es el primer hallazgo de RV-3 en *H. fleischmanni* y en *E. prosoblepon* en una zona urbana de Costa Rica (Whitfield et al., 2016; Whitfield et al., 2021). Aunque no se logró obtener la secuencia de las muestras positivas, los resultados están en concordancia con los hallazgos de RV-3 en *Teratohyla spinosa* en la Estación Biológica La

Selva en Sarapiquí (Whitfield et al., 2013) y en *E. prosoblepon* en la Estación Biológica las Cruces en San Vito de Coto Brus en Puntarenas (Whitfield et al., 2021). Se recomienda para próximas investigaciones utilizar una técnica más sensible como el PCR en tiempo real y seguir intentando secuenciar las muestras positivas que se obtengan.

Chlamydia spp. se logró detectar por qPCR en cuatro individuos en los tres sitios de estudio, tanto en hisopados de piel como en órganos internos de *H. fleischmanni* y *E. prosoblepon*, lo que concuerda con otros estudios moleculares en anfibios donde también utilizaron qPCR (gen *23S*) y PCR anidada (gen *ompA*) y detectaron la presencia de *Chlamydia* spp. en órganos internos (vesícula biliar, riñones, hígado, intestinos, corazón) y en la piel (Reed et al., 2000; Eisenberg et al., 2020). Hasta la fecha se han detectado cuatro especies y un nuevo género de *Chlamydia*: *Chlamydia psittaci* (Mutschmann., 1998), *Chlamydia pneumoniae* (Bodetti et al., 2002; Vajana et al., 2018; Fratzke et al., 2019; Eisenberg et al., 2020), *Chlamydia abortus* y *Chlamydia suis* con métodos moleculares como qPCR y PCR anidada, y el nuevo género “*Amphibiichlamydia ranarum*” mediante un qPCR específico del gen 16S (Martel et al., 2013; Vejana et al., 2018). Aunque no se logró secuenciar una muestra que resultó positiva en la PCR anidada para el gen *ompA*, se recomienda seguir investigando la presencia de especies de *Chlamydia* en anuros de Costa Rica y descartar la presencia de *Similichlamydia*, *Neochlamydia*, *Protochlamydia* y *Parachlamydia* (Vejana et al., 2018).

El PCR amplificando el gen *Bcsp31* para *Brucella* spp., demostró ser inespecífico, ya que en cinco muestras de órganos de ambas especies de ranas de vidrio se determinó mediante secuenciación la presencia de la bacteria *Achromobacter* spp., lo que confirma lo reportado por Fischer et al. (2012) y Eisenberg et al. (2012) que mencionan que *B. inopinata* y *Achromobacter* spp. pueden ser identificadas erróneamente, por lo que recomiendan utilizar genes y regiones específicas: dentro del gen *Bcsp31* la región *IS711*, el gen 16S ARNr y los genes *omp2a* y *recA*, que al utilizar este conjunto de genes y regiones se consigue una identificación correcta. En nuestro caso utilizamos únicamente un gen específico (*Bcsp31*).

Un estudio desarrollado en Panamá con la rana de vidrio *H. colymbiphyllum* detectó *Achromobacter* spp., tanto en animales adultos como en los huevos (Hughey et al., 2017); sin embargo, se desconoce la importancia de esta bacteria, se cree que pertenece

probablemente a la microbiota de la piel (Hughey et al., 2017). Otro estudio desarrollado en China con salamandras gigantes (*Andrias davidianus*) también llegó a la misma conclusión con *Achromobacter* spp. (Zhang et al., 2024).

Sin embargo, en el presente estudio se determinó la presencia de *Achromobacter* spp. en órganos internos (intestino e hígado), lo que podría deberse a una identificación errónea como ocurrió en la investigación desarrollada por Fischer et al. (2012) en donde se identificó la bacteria en la rana arbórea de ojos rojos inicialmente como una *Ochrobactrum anthropi* (anteriormente conocida como *Achromobacter* spp.) y resultó ser una especie de *Brucella*, por lo que se recomienda seguir investigando la presencia de especies de *Brucella* en zonas urbanas.

Nuestros resultados concuerdan con Zhang et al. (2024) y Hughey et al. (2017), donde reportan que las ranas positivas a *Achromobacter* spp. no presentaron ningún agente infeccioso y se presentó sólo en ranas sanas. Se recomienda continuar con las investigaciones sobre la composición de la microbiota de las dos especies de ranas urbanas de Costa Rica, ya que ante los resultados de esta investigación y las de otros países se podría sugerir que esta bacteria sea parte de la microbiota normal de las ranas de vidrio *H. fleischmanni* y *E. prosoblepon*.

Se detectaron infecciones mixtas en dos ranas, *H. fleischmanni* presentó Bd y *Chlamydia* spp. y *E. prosoblepon* RV-3 y *Chlamydia* spp. Las interacciones entre agentes infecciosos, en especial con el Bd, son desfavorables para el sistema inmunológico del individuo y como se mencionó anteriormente, un desbalance en la microbiota o la producción de péptidos en la piel de la rana por acción de agentes infecciosos podría ocasionarle graves problemas de salud e incluso la muerte (Woodhams et al., 2006; Abarca et al., 2021).

La detección de agentes infecciosos en especies de ranas de vidrio urbanas es una temática poco investigada en la actualidad, es por esto que la importancia de fortalecer este tipo de iniciativas permitiría aumentar la información científica y generar nuevas líneas de investigación con patógenos zoonóticos existentes en zonas urbanas.

El efecto de la contaminación de los ríos urbanos sobre el desarrollo y la sobrevivencia de los anfibios que habitan en ellos se ha estudiado poco (Sievers et al., 2019; Dunán et al., 2021); sin embargo, es importante, pues la piel de los anuros es altamente permeable y sensible, haciéndolos vulnerables a los contaminantes en el agua (Boyer y Grue, 1995; Demichelis et al., 2001). Es en las zonas urbanas donde los contaminantes exhiben una mayor concentración y variabilidad, incluyendo: grandes cantidades de materia orgánica, fertilizantes, agroquímicos, desechos farmacológicos e industriales, hidrocarburos, pesticidas, entre otros (Croteau et al., 2008; Basanta, 2019; Cuzziol et al., 2024). Por ejemplo, un desecho común de las industrias son los metales pesados como el aluminio y el zinc (Dunán et al., 2021), que han demostrado ser perjudiciales para los renacuajos provocando alteraciones en el peso, malformaciones en el aparato bucal e intestino y afectaciones a las células inmunológicas: linfocitos, leucocitos y neutrófilos (de Albuquerque et al., 2024).

Teniendo en cuenta el hábitat en el que estas ranas de vidrio se desarrollan surgió la necesidad de entender la influencia o posibles efectos de estos contaminantes sobre el desarrollo de los renacuajos de estas ranas. Se identificó que el promedio de desarrollo embrionario de los huevos de las ranas de vidrio puede durar hasta 17 días (Kubicki, 2007), lo cual concuerda con el período de la duración de eclosión de este estudio, por esto fue importante determinar el estadio de Gosner al inicio del experimento, ya que a partir del desarrollo inicial se puede medir el tiempo restante para la salida de las larvas. El T3 tuvo el estadio de Gosner más inmaduro (estadio 15) respecto a los demás tratamientos (Cuadro 2), pero se logró comprobar que la duración de eclosión es proporcional con el estadio, ya que fue la que más duró en eclosionar por completo (de 10 a 16 días), concordando así con el desarrollo embrionario normal de las ranas de vidrio según Kubicki (2007).

Los tratamientos T1 y T4 fueron en los que se estableció mayor supervivencia de los huevos hasta metamorfosis, además se determinó la mayor duración en días en el agua hasta iniciar la etapa terrestre. Esto podría deberse a que los niveles de la contaminación microbiológica y fisicoquímica del agua fue menor respecto al agua de los tratamientos T2 y T3 donde la supervivencia fue mucho menor y la metamorfosis más acelerada, presentando seis de los diez parámetros fisicoquímicos y microbiológicos más elevados y fuera de los límites sugeridos para ríos de Costa Rica (La Gaceta, 2007; Arce-Villalobos et al., 2022; OMS,

2022). Esto concuerda con lo mencionado por Ballesteros et al. (2024), quienes observaron que la contaminación o el estrés pueden acelerar la metamorfosis de los renacuajos haciendo que salgan más pronto del agua para estar menos tiempo expuestos a estas condiciones ambientales desfavorables.

A pesar de las condiciones aceleradas de metamorfosis obtenidas en T2 y T3, no se presentaron diferencias significativas respecto al tamaño (longitud total), coloración, comportamiento, movimientos de natación, ni alimentación de los renacuajos entre los tratamientos, esto puede deberse a que la muestra no fuera representativa para determinar efectos morfológicos o comportamentales, por lo que se recomienda repetir este experimento con una mayor cantidad de muestras. Aunque la temperatura del agua en los recintos fue menor (16° y 19°C) que la reportada para la crianza de renacuajos en cautiverio (25°-26°C), esto parece no haber afectado el metabolismo de los renacuajos, su desarrollo morfológico, ni la velocidad de metamorfosis (Borges et al., 2014).

En este estudio, los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del agua confirmaron la contaminación del río Torres en los tres sitios de investigación, determinándose no aptas para mantener el equilibrio natural de las comunidades acuáticas (Demichelis et al., 2001; Borges et al., 2014). Cinco de los parámetros medidos en el agua (PSO, SST, coliformes fecales, DBO y fosfatos) se encontraron fuera de los límites establecidos. Sin embargo, la gran ventaja de los ríos es que sus aguas constantemente fluyen y cambian su condición fisicoquímica y microbiológica continuamente, esta ventaja permitió probablemente la presencia del oxígeno mecánico, incorporado al agua por el movimiento constante de la corriente (Pérez-Castillo y Rodríguez, 2008), aun así, el porcentaje de saturación de oxígeno se mostró inferior a los límites normales. Por el contrario, el DBO superó los límites normales (Cuadro 3), lo que puede deberse al aumento en las actividades de descomposición de materia orgánica aportada por las altas cantidades de coliformes fecales detectados en los tres sitios y nutrientes en exceso como el fosfato medido (Demichelis et al., 2001). Estas condiciones de contaminación afectaron la velocidad de metamorfosis y la supervivencia, debido a que dificultó que los renacuajos tuvieran las condiciones óptimas que si tuvieron en el tratamiento control (T1), donde estos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos se mantuvieron constantes y dentro de los límites normales.

La contaminación fecal medida al inicio del estudio mostró diferencias marcadas en la cantidad de coliformes fecales (*Escherichia coli*) en cada sitio, lo que pudo haber influido en el tiempo de metamorfosis y en la mortalidad de renacuajos, aunque esto ha sido poco estudiado hasta la fecha. Una investigación realizada en Tennessee, Estados Unidos, sugirió la posibilidad, que metamorfos de la rana toro (*Rana catesbeiana*) eliminaran la *E. coli* ingerida como renacuajos; sin embargo, esto afectó el sistema inmunológico y sufrieron infecciones sistémicas en etapa de metamorfos (Gray et al., 2007). Se recomienda realizar más estudios para establecer si los coliformes fecales afectan a los renacuajos de la rana *E. prosoblepon* o cualquier otra especie de rana de vidrio.

Finalmente, se detectó la presencia de *Achromobacter* spp. en huevos del T1, esta bacteria ha sido reportada en huevos y adultos de la rana de vidrio *Hyalinobatrachium colymbiphylum* en un estudio realizado en Panamá (Hughey y Belden, 2017). Se cree que podrían ser parte de la flora bacteriana normal y tener una función de protección contra patógenos en adultos y huevos (Hughey y Belden, 2017). Se requiere de más investigación para comprobar que esta bacteria sea parte de su microbiota o un agente infeccioso. No se detectó la presencia de Bd, *Chlamydia* spp., *Brucella* spp. ni *Ranavirus 3* en los huevos recolectados. En el caso de la ausencia de Bd podría deberse a dos razones principales: 1- este hongo requiere queratina para poder desarrollarse y los huevos no poseen queratina, 2- poseen una capa gelatinosa que impide que el hongo colonice los embriones (OIE, 2019). En cuanto al *Ranavirus 3*, se sabe que puede causar la muerte de embriones y larvas después de varios días de la inoculación del virus en el individuo (Rakesh y Granoff, 1999). La no detección de *Chlamydia* al igual que los agentes anteriores podría deberse también al tamaño de muestra, quizá al realizarlo en mayor cantidad de masas de huevos y tomar la muestra *in situ*, podría arrojar otros resultados.

Bibliografía

Abad, L., Mejía, D., León, P., Cárdenas, I., Pacheco, B., & Tonon, M. D. (2017). Calidad del Agua y Variables Ambientales en Hábitats para Anfibios Amenazados en la Zona Urbana de Cuenca. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, (18), 18-34.

- Abarca, J. G., Whitfield, S. M., Zuniga-Chaves, I., Alvarado, G., Kerby, J., Murillo-Cruz, C., & Pinto-Tomás, A. A. (2021). Genotyping and differential bacterial inhibition of *Batrachochytrium dendrobatidis* in threatened amphibians in Costa Rica. *Microbiology*, 167(3), 001017.
- Aguilar-López, J. L., Ortiz-Lozada, L., Pelayo-Martínez, J., Mota-Vargas, C., Alarcón-Villegas, L. E., & Demeneghi-Calatayud, A. P. (2020). Diversidad y conservación de anfibios y reptiles en un área protegida privada de una región altamente transformada en el sur de Veracruz, México. *Acta zoológica mexicana*, 36, e3612164. <https://doi.org/10.21829/azm.2020.3612164>.
- AmphibiaWeb. (2024). <<https://amphibiaweb.org>> University of California, Berkeley, CA, USA. Recuperado el 27 de febrero del 2024.
- Angeli, N. F., DiRenzo, G. V., Cunha, A., & Lips, K. R. (2015). Effects of density on spatial aggregation and habitat associations of the glass frog *Espadarana* (*Centrolene*) *prosohlepon*. *Journal of Herpetology*, 49(3), 388-394.
- Arce-Villalobos, K., Sánchez-Gutiérrez, R., Centeno-Morales, J., Marín-León, R., & Rodríguez-Rodríguez, J. A. (2022). Calidad del agua superficial y presiones socioambientales en la microcuenca alta del río Poás. *Uniciencia*, 36(1), 382-404.
- Ballesteros, E., Bolaños, F., Ruepert, C., Jiménez, R., Bonilla, F., & Sasa, M. (2024). Immunological and physiological responses to predation risk and sublethal concentrations of chlorothalonil and β -endosulfan in *Lithobates taylori* (Anura: Ranidae) tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 107071.
- Bancila, R. I., Hartel T., Plaiasu R., Smets J., & Cogalniceanu, D. (2010). Comparing three body condition indices in amphibians: a case study of yellow-bellied toad *Bombina variegata*. *Amphibia-Reptilia*, 31, 558-562.
- Basanta, M. D. (2019). Ecología y evolución de enfermedades emergentes en anfibios: una revisión de *Ranavirus* y quitridiomycosis. *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 2(1), 9-25.
- Basto-Riascos, M. C., López-Caro, J., & Londoño-Guarnizo, C. A. (2017). *Espadarana prosohlepon*. *Anfibios y Reptiles*, 52.
- Bodetti, T. J., Jacobson, E., Wan, C., Hafner, L., Pospischil, A., Rose, K., & Timms, P. (2002). Molecular evidence to support the expansion of the hostrange of

- Chlamydomytila pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Systematic and applied microbiology*, 25(1), 146-152.
- Borges, F. D. F., Stéfani, M. V. D., & Amaral, L. A. D. (2014). Quality of the effluents of bullfrog tadpole ponds. *Boletim do instituto de pesca*, 409-417.
- Bosch, J. (2003). Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. *Munibe*, 16, 56-73.
- Boyer, R., & Grue, C. E. (1995). The need for water quality criteria for frogs. *Environmental health perspectives*, 103(4), 352-357.
- Boyle, D. G., Boyle, D. B., Olsen, V., Morgan, J. A. T., & Hyatt, A. D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of aquatic organisms*, 60(2), 141-148.
- Bravo, J., & Moreno, G. (2020). Chytridiomycosis en anfibios. *Bol. Soc. Micol*, 27-49.
- Buckle, K., Roe, W. D., Howe, L., Michael, S., Duignan, P. J., Burrows, E., ... & McDonald, W. L. (2017). Brucellosis in endangered Hector's dolphins (*Cephalorhynchus hectori*). *Veterinary pathology*, 54(5), 838-845.
- Burnard, D., & Polkinghorne, A. (2016). Chlamydial infections in wildlife-conservation threats and/or reservoirs of 'spill-over' infections? *Veterinary microbiology*, 196, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.018>.
- Campbell, L.A., Kuo, C.C. & Grayston, J.T. (1998). *Chlamydia pneumoniae* and cardiovascular disease. *Emerg Infect Dis*. 4: 571-579.
- Carr, R (2017). XLStatistics: Excel workbooks for statistical analysis. Version 17-02-16. <https://www.deakin.edu.au/individuals-sites/?request=~rodneyc/XLStatistics.r>
- Cisneros-Heredia, D. F., Delia, J., Yáñez-Muñoz, M. H., & Ortega-Andrade, H. M. (2010). Endemic Ecuadorian glassfrog *Cochranella mache* is Critically Endangered because of habitat loss. *Oryx*, 44(1), 114-117. <https://doi.org/10.1017/S0030605309990640>.
- Cohen Jr, M. M. (2001). Frog decline, frog malformations, and a comparison of frog and human health. *American Journal of Medical Genetics*, 104(2), 101-109.
- Croteau, M. C., Hogan, N., Gibson, J. C., Lean, D., & Trudeau, V. L. (2008). Toxicological threats to amphibians and reptiles in urban environments. *Urban Herpetology*, 3, 197-209.

- Cuzziol Boccioni, A. P., Peltzer, P. M., Attademo, A. M., Leiva, L., Colussi, C. L., Repetti, M. R., ... & Lajmanovich, R. C. (2024). High toxicity of agro-industrial wastewater on aquatic fauna of a South American stream: Mortality of aquatic turtles and amphibian tadpoles as bioindicators of environmental health. *Water Environment Research*, 96(3), e11010.
- de Albuquerque, V. J., Folador, A., Müller, C., Pompermaier, A., Hartmann, M., & Hartmann, P. A. (2024). How do different concentrations of aluminum and zinc affect the survival, body size, morphology and immune system of *Physalaemus cuvieri* (Fitzinger, 1826) tadpole?. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 1-15.
- de Vergara, R. S., Hoyos, D. A. G., Alvarado, G., Abarca, J. G., Estrella, J., Schipper, J., & Maya, J. F. G. (2022). Prevalencia del hongo quitridio en la “especie abanderada” *Atelopus varius* (Anura, Bufonidae), Zona Protectora las Tablas, Costa Rica. *UNED Research Journal*, 14(S1), e3880-e3880.
- de Vergara, R. S., Hoyos, D. A. G., Alvarado, G., Abarca, J. G., Estrella, J., Schipper, J., & Maya, J. F. G. (2022). Prevalencia del hongo quitridio en la “especie abanderada” *Atelopus varius* (Anura, Bufonidae), Zona Protectora las Tablas, Costa Rica. *UNED Research Journal*, 14(S1), e3880-e3880.
- Demichelis, S. O., De La Torre, F. R., Ferrari, L., Garcia, M. E., & Salibian, A. (2001). Tadpoles assay: Its application to a water toxicity assessment of a polluted urban river. *Environmental monitoring and assessment*, 68, 63-73.
- Díaz-García, J. M. (2019). Servicios ecosistémicos de los anfibios en México: un análisis de diversidad, distribución y conservación. *Etnobiología*, 17(1), 49-60.
- DiRenzo, G. V., Tunstall, T. S., Ibáñez, R., deVries, M. S., Longo, A. V., Zamudio, K. R., & Lips, K. R. (2018). External reinfection of a fungal pathogen does not contribute to pathogen growth. *EcoHealth*, 15(4), 815-826.
- Duffus, A. L., Waltzek, T. B., Stöhr, A. C., Allender, M. C., Gotesman, M., Whittington, R. J., ... & Marschang, R. E. (2015). Distribution and host range of ranaviruses. In *Ranaviruses* (pp. 9-57). Springer, Cham.
- Dunán Ávila, P. L., Fernández Rodríguez, M., Riverón Zaldívar, A. B., & Bassas Noa, P. R. (2021). Evaluación del contenido de metales pesados en las aguas del Río Yamanigüey.

- Eisenberg, T., Fawzy, A., Kaim, U., Nessler, A., Riße, K., Völker, I., ... & Sting, R. (2020). Chronic wasting associated with *Chlamydia pneumoniae* in three ex situ breeding facilities for tropical frogs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113, 2139-2154.
- Eisenberg, T., Hamann, H. P., Kaim, U., Schlez, K., Seeger, H., Schauerte, N., ... & Zschöck, M. (2012). Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Applied and environmental microbiology*, 78(10), 3753-3755.
- Espinoza, C., & Villalta, R. (2004). Primera etapa del plan de manejo integral del recurso hídrico: la estrategia nacional para la GIRH en Costa Rica. Estudio de caso sobre la contaminación de la cuenca de los ríos Virilla y Grande de Tárcoles. San José, Costa Rica: Ministerio del Ambiente y Energía (MINAE).
- Everett, K.D., Hornung, L.H. & Andersen, A.A. (1999). Rapid detection of the Chlamydiaceae and other families in the order Chlamydiales: three PCR tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 575-580.
- Ficht, T. (2010). *Brucella* taxonomy and evolution. *Future microbiology*, 5(6), 859-866. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.52>.
- Fischer, D., Lorenz, N., Heuser, W., Kämpfer, P., Scholz, H. C., & Lierz, M. (2012). Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 43(3), 625-628.
- Fratzke, A., Howard, L. L., Tociłowski, M. E., Armien, A., Oliveira, F., Ritchie, B., ... & Snook, E. (2019). *Chlamydia pneumoniae* polyencephalomyelitis and ganglionitis in captive Houston toads (*Anaxyrus houstonensis*). *Veterinary pathology*, 56(5), 789-793.
- Garmyn, A., Van Rooij, P., Pasmans, F., Hellebuyck, T., Van Den Broeck, W., Haesebrouck, F., & Martel, A. (2012). Waterfowl: potential environmental reservoirs of the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PloS one*, 7(4), e35038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035038>.
- Ghose, S., M. A. Donnelly, J. L. Kerby, & S. M. Whitfield. (2014). Acute toxicity tests and metaanalysis identify gaps in tropical ecotoxicology for amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(9): 2114-2119.
- Glabman, R. A., Thompson, K. A., Mani, R., Colburn, R., & Agnew, D. W. (2021). Atypical *Brucella inopinata*-Like Species in 2 Marine Toads. *Emerging Infectious Diseases*, 27(6), 1748.

- Goka, K., Yokoyama, J. U. N., Une, Y., Kuroki, T., Suzuki, K., Nakahara, M., ... & Hyatt, A. D. (2009). Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular ecology*, 18(23), 4757-4774.
- Goldberg, T. L., Coleman, D. A., Grant, E. C., Inendino, K. R., & Philipp, D. P. (2003). Strain variation in an emerging iridovirus of warm-water fishes. *Journal of virology*, 77(16), 8812-8818.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.
- Gray, M. J., Rajeev, S., Miller, D. L., Schmutzer, A. C., Burton, E. C., Rogers, E. D., & Hickling, G. J. (2007). Preliminary evidence that American bullfrogs (*Rana catesbeiana*) are suitable hosts for *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 4066-4068.
- Greenberg, D. A., & Palen, W. J. (2021). Hydrothermal physiology and climate vulnerability in amphibians. *Proceedings of the Royal Society B*, 288(1945), 20202273.
- Grupo de Investigación de Biología Matemática y Matemática Aplicada (GIBIMMA), Grupo de Investigación en Biotecnología Microbiana & Grupo de Investigación en Salud Pública. (2023). *Escherichia coli* y colifagos somáticos: bioindicadores de contaminación fecal en el Lago Guamuez. Editorial Universidad de Nariño.
- Guayasamin, J. M., Cisneros-Heredia, D. F., McDiarmid, R. W., Peña, P., & Hutter, C. R. (2020). Glassfrogs of Ecuador: diversity, evolution, and conservation. *Diversity*, 12(6), 222.
- Guo, W., Li, J., Kaltenboeck, B., Gong, J., Fan, W., & Wang, C. (2016). *Chlamydia gallinacea*, not *C. psittaci*, is the endemic chlamydial species in chicken (*Gallus gallus*). *Scientific reports*, 6(1), 19638.
- Hall, R. J., & Henry, P. F. (1992). Assessing effects of pesticides on amphibians and reptiles: status and needs. *Herpetological Journal* 2(3), 65-71.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95- 98.
- Holdridge, L. R. (1982). *Ecología basada en zonas de vida*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

- Homola, J. J., Loftin, C. S., & Kinnison, M. T. (2019). Landscape genetics reveals unique and shared effects of urbanization for two sympatric pool-breeding amphibians. *Ecology and evolution*, 9(20), 11799-11823. <https://doi.org/10.1002/ece3.5685>.
- Hughey, M. C., Delia, J., & Belden, L. K. (2017). Diversity and stability of egg-bacterial assemblages: The role of paternal care in the glassfrog *Hyalinobatrachium colymbiphylum*. *Biotropica*, 49(6), 792-802.
- ICTV, Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (2024). Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. *Nucleic Acids Res.* 2017 Oct 13. PubMed PMID: 29040670. <https://ictv.global/>
- IUCN SSC Amphibian Specialist Group. (2024). Amphibian conservation action plan: A status review and roadmap for global amphibian conservation. Wren, S., Borzée, A., Marcec-Greaves, R. & Angulo, A. (Eds.). IUCN SSC Occasional Paper, No 57. Gland, Switzerland: IUCN.
- IUCN. (2022). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>. Consultado [08 de noviembre de 2023].
- Kimura, M., Une, Y., Suzuki, M., Park, E. S., Imaoka, K., & Morikawa, S. (2017). Isolation of *Brucella inopinata*-like bacteria from White's and Denny's tree frogs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(5), 297-302.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012). *Virus Taxonomy, Family – Iridoviridae*. Elsevier (193-210), ISBN 9780123846846.
- Klemens, J. A., Wieland, M. L., Flanagin, V. J., Frick, J. A., & Harper, R. G. (2003). A cross-taxa survey of organochlorine pesticide contamination in a Costa Rican wildland. *Environmental pollution*, 122(2), 245-251.
- Kubicki, B. (2007). *Ranas de vidrio de Costa Rica*. Primera edición, Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Costa Rica.
- Küng, D., Bigler, L., Davis, L. R., Gratwicke, B., Griffith, E., & Woodhams, D. C. (2014). Stability of microbiota facilitated by host immune regulation: informing probiotic strategies to manage amphibian disease. *PLoS One*, 9(1), e87101.
- La Gaceta. (2007). *Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpo de Agua Superficiales N° 33903-MINAE-S*. San José, Costa Rica: Imprenta Nacional.

- Levorse, A. (2018). Interactions between two key amphibian defenses to *Batrachochytrium dendrobatidis* in Panamanian glass frogs (*Espadarana prosoblepon*).
- Martel, A., Adriaensen, C., Sharifian-Fard, M., Vandewoestyne, M., Deforce, D., Favoreel, H., ... & Pasmans, F. (2013). The novel 'Candidatus *Amphibiichlamydia ranarum*' is highly prevalent in invasive exotic bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 105-108.
- Méndez, M., Obando, P., Pinnock-Branford, M., Ruepert, C., Castillo, L. E., Mena, F., & Alvarado, G. (2016). Acute, chronic and biochemical effects of chlorothalonil on *Agalychnis callidryas*, *Isthmohyla pseudopuma* and *Smilisca baudinii* tadpoles. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 21238-21248.
- Mendoza, A. M., Bolívar-García, W., Vázquez-Domínguez, E., Ibáñez, R., Parra-Olea, G. (2019). The role of Central American barriers in shaping the evolutionary history of the northernmost glassfrog, *Hyalinobatrachium fleischmanni* (Anura: Centrolenidae). *PeerJ*, 3(7), e6115. <https://doi.org/10.7717/peerj.6115>.
- Mitura, A., Niemczuk, K., Zaręba, K., Zając, M., Laroucau, K., & Szymańska-Czerwińska, M. (2017). Free-living and captive turtles and tortoises as carriers of new *Chlamydia* spp. *PloS one*, 12(9), e0185407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185407>.
- Montalvão, M. F., daSilva-Castro, A. L., deLima-Rodrigues, A. S., deOliveira-Mendes, B., & Malafaia, G. (2018). Impacts of tannery effluent on development and morphological characters in a neotropical tadpole. *Science of the Total Environment*, 610-611, 1595-1606. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.134>.
- Moreno-Ortiz, Victor Cesar, Martínez-Núñez, Juan Manuel, Kravzov-Jinich, Jaime, Pérez-Hernández, Luis Alberto, Moreno-Bonett, Consuelo, & Altagracia-Martínez, Marina. (2013). Los medicamentos de receta de origen sintético y su impacto en el medio ambiente. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(4), 17-29. Recuperado en 05 de septiembre de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000400003&lng=es&tlng=es.
- Mutschmann, F. (1998). Nachweis von *Chlamydia psittaci*-Infektionen bei amphibiens mittels eines spezifischen Immunfluoreszenztests [Detection of *Chlamydia psittaci* infections in amphibians using an immunofluorescence test]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 111(5):187-9. German. PMID: 9639956.

- Nowakowski, A. J., Watling, J. I., Whitfield, S. M., Todd, B. D., Kurz, D. J., & Donnelly, M. A. (2017). Tropical amphibians in shifting thermal landscapes under land-use and climate change. *Conservation biology*, 31(1), 96-105. <https://doi.org/10.1111/cobi.12769>
- Ohlemeyer, S., Holopainen, R., Tapiovaara, H., Bergmann, S. M., & Schütze, H. (2011). Major capsid protein gene sequence analysis of the Santee-Cooper ranaviruses DFV, GV6, and LMBV. *Diseases of aquatic organisms*, 96(3), 195-207.
- OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal). (2019). Infection with Ranavirus. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/current/chapitre_ranavirus.pdf
- OIE (Organización Mundial de la Sanidad Animal). (2021). RANAVIRUSES Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control Potential Impacts of Disease Agent Beyond Clinical Illness References. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/ranavirusesinfection-with.pdf>
- Oram, B. (2013). Online Calculator for Determining a Water Quality Index. Dallas, United States of America: National Sanitation Foundation (NSF). Recuperado de <http://www.water-research.net/index.php/water-treatment/water-monitoring/monitoring-the-quality-of-surfacewaters>
- Organización Mundial de la Salud-OMS. (2022). *Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda*. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Peng, L., Liang, G. F., & Qiu, P. W. (2021). Effects of microhabitat characteristics on amphibian diversity in urban water system of Kaifeng, Henan, China. *The journal of applied ecology*, 32(7), 2597-2603. <https://doi.org/10.13287/j.1001-9332.202107.038>.
- Pérez-Castillo, A. G., & Rodríguez, A. (2008). Índice fisicoquímico de la calidad de agua para el manejo de lagunas tropicales de inundación. *Revista de Biología tropical*, 56(4), 1905-1918.
- Pérez-Gómez, G., & Jiménez-Rocha, A. E. (2024). Parásitos gastrointestinales zoonóticos y no zoonóticos en ranas de un río urbano tropical de Costa Rica. *UNED Research Journal*, 16, e4803-e4803.

- Pérez-Gómez, G., Alvarado-García, V., Rodríguez-Rodríguez, J. A., Herrera, F., & Sánchez-Gutiérrez, R. (2021). Calidad fisicoquímica y microbiológica del agua superficial del río Grande de Tárcos, Costa Rica: un enfoque ecológico. *UNED Research Journal*, 13(1), 69-86. <https://doi.org/10.22458/urj.v13i1.3148>
- Pérez-Gómez, G., Jiménez-Rocha, A. E & T, Bermúdez-Rojas. (2018). Parásitos gastrointestinales de aves silvestres en un ecosistema urbano tropical en Heredia, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 66 (2): 788-798p.
- Rakesh M. Goorha y Allan Granoff. (1999). FROG VIRUS 3 (IRIDOVIRIDAE). EN: *Encyclopedia of Virology (Second Edition)*. Ed: Allan Granoff y Robert G. Webster. Elsevier, Ámsterdam, Países Bajos. 582-587. ISBN 9780122270307, <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0105>.
- Rebollar, E. A., Hughey, M. C., Medina, D., Harris, R. N., Ibáñez, R., & Belden, L. K. (2016). Skin bacterial diversity of Panamanian frogs is associated with host susceptibility and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *The ISME journal*, 10(7), 1682-1695.
- Reed, K. D., Ruth, G. R., Meyer, J. A., & Shukla, S. K. (2000). *Chlamydia pneumoniae* infection in a breeding colony of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Emerging Infectious Diseases*, 6(2), 196.
- Rojas-Morales, J. A., Castro-Gómez, A., & Escobar-Lasso, S. (2014). Joyas de los Andes tropicales: Colombia tierra de Ranas de Cristal. *Bioma*, 19(2), 1-38.
- Santos, T., Melo, R., Costa-Silva, D., Nunes, M., Rodrigues, N., & Franco, J. (2015). Assessment of water pollution in the Brazilian Pampa biome by means of stress biomarkers in tadpoles of the leaf frog *Phyllomedusa iheringii* (Anura: Hylidae) *PeerJ*, 3, e1016 <https://doi.org/10.7717/peerj.1016>.
- Satei, E., Mirshahabi, H., Zeighami, H., Ghoolobi, A., & Sadeghi, H. (2020). Molecular survey of BCSP31 and IS711 using PCR assays in detection of *Brucella* spp. in raw milk. *Meta Gene*, 24, 100683.
- Savage, J. M. (2002). *The amphibians and reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas*. University of Chicago press.
- Scheele, B. C., Pasmans, F., Skerratt, L. F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A. A., Burrowes, P. A., Carvalho, T., Catenazzi, A., De la Riva, I., Fisher, M. C., Flechas, S. V., Foster, C. N., Frías-Álvarez, P., Garner, T. W. J., Gratwicke, B., Guayasamin, J. M., Hirschfeld, M., ... Canessa, S. (2019). Amphibian fungal

- panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*, 363(6434), 1459-1463. <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>.
- Sievers, M., Hale, R., Swearer, S. E., & Parris, K. M. (2019). Frog occupancy of polluted wetlands in urban landscapes. *Conservation Biology*, 33(2), 389-402.
- Smith, G. R., & Burgett, A. A. (2005). Effects of three organic wastewater contaminants on American toad, *Bufo americanus*, tadpoles. *Ecotoxicology*, 14, 477-482.
- Sreedharan, G., Singh Panwar, Y., Murthy, S., Klop-Toker, K., Ibáñez, R., Illueca, E. E., ... & Vasudevan, K. (2023). A Universal and Efficient Detection of Chytridiomycosis Infections in Amphibians Using Novel Quantitative PCR Markers. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2023, 1-9.
- Strong, R., Martin, F. L., Jones, K. C., Shore, R. F., & Halsall, C. J. (2017). Subtle effects of environmental stress observed in the early life stages of the Common frog, *Rana temporaria*. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Tamukai, K., Tokiwa, T., Kobayashi, H., & Une, Y. (2016). Ranavirus in an outbreak of dermatophilosis in captive inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *Veterinary dermatology*, 27(2), 99-e28.
- Teixeira, M. Z. (2013). La evidencia científica del modelo epistemológico homeopático. *Homeopatía Méx*, 82(685), 5-20.
- Trujillo-Acosta, A., Peraza-Estrella, M. J., Marina-Hipólito, J. G., & Boraschi, S. F. (2017). Evaluación del Corredor Interurbano Río Torres, Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 14(34), 53-62.
- Vajana E, Widmer I, Rochat E, Duruz S, Selmoni O, Vuilleumier S, Aeby S, Greub G, Joost S. (2018) Indication of spatially random occurrence of *Chlamydia*-like organisms in *Bufo bufo* tadpoles from ponds located in the Geneva metropolitan area. *New Microbes New Infect*; 27:54-63. doi: 10.1016/j.nmni.2018.11.006. PMID: 30622711; PMCID: PMC6307092.
- Velásquez, B. E., Castro, F., Bolívar, W., & Herrera, M. I. (2007). Infection by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in anurans from Cordillera Occidental in Colombia. *Herpetotropicos: Tropical Amphibians & Reptiles*, 4(2), 65-71.
- Villasenor, N. R., Driscoll, D. A., Gibbons, P., Calhoun, A. J., & Lindenmayer, D. B. (2017). The relative importance of aquatic and terrestrial variables for frogs in an urbanizing

- landscape: Key insights for sustainable urban development. *Landscape and Urban Planning*, 157, 26-35.
- Voyles, J., Berger, L., Young, S., Speare, R., Webb, R., Warner, J., Rudd, D., Campbell, R., & Skerratt, L. F. (2007). Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. *Diseases of aquatic organisms*, 77(2), 113-118. <https://doi.org/10.3354/dao01838>.
- Vredenburg, V. T., & Briggs, C. (2007). Chytrid Swab Protocol. http://amphibiaweb.org/chytrid/swab_instruction_Spanish_2009.pdf.
- Walke, J. B., Harris, R. N., Reinert, L. K., Rollins-Smith, L. A., & Woodhams, D. C. (2011). Social immunity in amphibians: evidence for vertical transmission of innate defenses. *Biotropica*, 43(4), 396-400.
- Whitfield, S. M., Alvarado-Barboza, G., Abarca, J. G., Zumbado-Ulate, H., Jiménez, R. R., & Kerby, J. (2021). Ranavirus is widespread in Costa Rica and co-occurs with threatened amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms*, 144, 89-98.
- Whitfield, S. M., Geerdes, E., Chacon, I., Rodriguez, E. B., Jimenez, R. R., Donnelly, M. A., & Kerby, J. L. (2013). Infection and co-infection by the amphibian chytrid fungus and ranavirus in wild Costa Rican frogs. *Diseases of aquatic organisms*, 104(2), 173-178.
- Whitfield, S. M., Lips, K. R., & Donnelly, M. A. (2016). Amphibian decline and conservation in Central America. *Copeia*, 104(2), 351-379.
- Woodhams, D. C., Voyles, J., Lips, K. R., Carey, C., & Rollins-Smith, L. A. (2006). Predicted disease susceptibility in a Panamanian amphibian assemblage based on skin peptide defenses. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(2), 207-218.
- Zhang, H., Ma, H., Jiang, W., Deng, J., Yuan, J., Fang, C., ... & Wang, Q. (2024). Bacterial community analysis of the skin microbiota of cultured Chinese giant salamander infected with Ranavirus. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1356161.
- Zumbado-Ulate, H., Nelson, K. N., García-Rodríguez, A., Chaves, G., Arias, E., Bolaños, F., ... & Searle, C. L. (2019). Endemic infection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Costa Rica: Implications for amphibian conservation at regional and species level. *Diversity*, 11(8), 129.

Conclusiones generales

- Se detectó por primera vez la presencia de Bd en *H. fleischmanni*, aumentando a siete especies de ranas de vidrio costarricenses positivas a Bd.
- Se detectó RV-3 en el hígado de *E. prosoblepon*, evidenciando la importancia de continuar la búsqueda de este patógeno en ambas especies de centrolénidos urbanos costarricenses.
- Se detectó por primera vez *Chlamydia* spp. tanto en *H. fleischmanni* como en *E. prosoblepon*.
- Se detectó por primera vez *Achromobacter* spp. en *H. fleischmanni* y *E. prosoblepon*.
- Todos los individuos (infectados y no infectados) mostraron un EOG e ICC dentro de los parámetros normales. Podría considerarse que sólo se trata de la detección de los agentes infecciosos y no de una infección que afecte dicha población; sin embargo, se requiere de más estudios con un mayor número de individuos que permita un mejor panorama de la salud de estas ranas de vidrio.
- Se determinó diferencia significativa entre los tratamientos con respecto a la duración de la salida de los renacuajos del agua. Así los renacuajos del T1 y T4 duraron más días en llegar a metamorfosis con respecto al T3 y T2.
- Los terrarios T1 y T4 fueron en los que se estableció mayor supervivencia de los huevos hasta metamorfos, además, se determinó la mayor duración en días de los renacuajos en el agua hasta iniciar la etapa terrestre.
- No se determinaron diferencias con respecto al tamaño (longitud total), coloración, comportamiento, movimientos de natación ni alimentación en ninguno de los tratamientos.
- En los tres sitios de estudio se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos y microbiológicos alterados: saturación oxígeno, sólidos sedimentables totales, coliformes fecales, demanda bioquímica de oxígeno y fosfatos.
- Los sitios 2 y 3 presentaron mayor cantidad de coliformes fecales en el agua y eventualmente esto afectó la supervivencia y mortalidad de los renacuajos criados en los tratamientos con agua proveniente de esos sitios.
- Los índices de calidad de agua, tanto el NSF como el RECAAS determinaron la calidad del agua del sitio 1 y 2 como media y la del sitio 3 como mala.

- Se detectó *Achromobacter* spp. en los huevos de *E. prosoblepon*, no se detectó Bd, *Chlamydia* spp., *Brucella* spp. ni *Ranavirus* 3.

Recomendaciones generales

- Continuar realizando estudios para determinar la presencia y efecto de los agentes infecciosos en los anfibios costarricenses.
- Determinar si la cepa de Bd encontrada en el Parque del Este y San Ramón de Tres Ríos es patógena y si tiene relación con la cepa ya encontrada en el país.
- Estudiar la importancia de la cepa Bd en un ambiente contaminado con bacterias de origen urbano para determinar si existe afectación de la composición de la microbiota y producción de péptidos de *H. fleischmanni* y *E. prosoblepon*.
- Implementar una técnica más sensible como la PCR en tiempo real para detectar RV-3 y tratar de secuenciar RV-3 para confirmar los resultados.
- Confirmar la presencia de especies de *Chlamydia* y especies similares en anuros de Costa Rica, mediante la amplificación del gen 16S del ARNr o la región espaciadora del 16s-23s del ADNr.
- Aumentar los esfuerzos de investigación experimental en renacuajos de diferentes especies de ranas de vidrio para detectar los efectos de los coliformes fecales.
- Realizar investigación sobre la microbiota en ranas de vidrio.
- Realizar este experimento con una mayor cantidad de huevos y hacer recombinación de huevos para aumentar la variabilidad genética en el experimento.
- Aumentar los monitoreos urbanos en anuros urbanos para identificar las necesidades ambientales como: conservación del hábitat y mejora sanitaria respecto al manejo de aguas negras y desechos sólidos.