

Detecção do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* por meio de nested PCR

Luisa P. Ribeiro^{1,2}; Silvio C. Almeida³; Jacqueline Kasue Kurissio⁴; João Pessoa Araújo Júnior⁴; Tarsila Franckin⁵; Luís Felipe Toledo²; Sandra M. G. Bosco⁵

¹ Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Avenida Bertrand Russell, s/nº, Cidade Universitária, CEP 13083-865, Campinas, SP, Brasil. E-mail: lupribeiro70@gmail.com

² Laboratório de História Natural de Anfíbios Brasileiros (LaHNAB), Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Rua Monteiro Lobato, 255, Cidade Universitária, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

³ Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

Rua Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº, Rubião Júnior, CEP 18618-689, Botucatu, SP, Brasil.

⁴ Instituto de Biotecnologia (IBTEC), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

Alameda das Tecomárias, s/nº, Chácara Capão Bonito, CEP 18607-440, Botucatu, SP, Brasil.

⁵ Laboratório de Micologia Médica, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP).

Rua Professor Doutor Plínio Pinto e Silva, s/nº, Rubião Júnior, CEP 18618-691, Botucatu, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

A quitridiomicose é uma doença causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) e é severa para anfíbios de todo o mundo, tendo sido responsável por diversos episódios de declínio populacional (Olson & Ronnenberg 2014, James *et al.* 2015). As técnicas utilizadas para a detecção de *Bd* nos anfíbios vão desde exames histopatológicos e identificação visual (Berger *et al.* 1998, Longcore *et al.* 1999, Vieira & Toledo 2002), até técnicas de biologia molecular, como PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*). Atualmente, o PCR quantitativo (qPCR ou PCR em tempo real), apesar de caro, é o método mais utilizado, por ser rápido, não invasivo (permite detecção múltipla de animais vivos), altamente sensível e por possuir especificidade maior do que qualquer outro método de diagnóstico disponível (Hyatt *et al.* 2007). Apesar dos métodos para detecção do *Bd* terem sido recentemente revisados (Lambertini *et al.*, 2013), a utilização do nested PCR ainda não foi avaliada pela literatura.

Dessa forma, apresentamos aqui um protocolo da técnica de nested PCR para detecção de *Bd*, e comparamos sua sensibilidade com as técnicas de PCR convencional e qPCR.

METODOLOGIA

Procedimento para coleta das amostras

A coleta do material clínico dos anfíbios é realizada através da técnica de *swabbing*, que consiste na utilização de cotonetes estéreis secos, de hastes plásticas, para friccionar a pele dos anfíbios (Figura 1). Como já descrito por Lambertini *et al.* (2013), o *swab* deve ser passado 5 vezes na região inguinal, 5 vezes nas regiões interdigitais dos membros inferiores e 5 vezes nas regiões interdigitais dos membros superiores (Figura 1). Todo procedimento deve ser realizado utilizando-se luvas, que são descartadas após a manipulação de cada espécime, para evitar



Figura 1: A: *Swabbing* do membro anterior de adulto de *Aplastodiscus perviridis*; B: *Swabbing* da região inguinal de adulto de *Aplastodiscus perviridis*.

contaminação cruzada. Após a coleta do material, cada *swab* deve ser acondicionado em criotubos de 1,5 mL secos ou contendo álcool P.A. e estocado em freezer a -20°C até a realização da extração de DNA.

Extração DNA do controle positivo para *Bd*

A fim de padronizar as reações de PCR, deve-se realizar a extração de DNA da cultura pura do fungo *Bd*. Para isso, deve-se preparar inóculos de *Bd* em placas de ágar Triptona 1% (Longcore *et al.* 1999). As culturas devem ser mantidas em estufa à 21°C por aproximadamente 7 dias. A extração de DNA do fungo pode ser realizada utilizando o protocolo descrito por McCullough *et al.* (2000) ou de acordo com Lambertini *et al.* (2013).

Extração de DNA das amostras

As amostras coletadas de *swabs* de pele devem ser submetidas à extração de DNA. A extração pode ser feita utilizando o kit comercial (GFX™ Genomic and Blood DNA Purification Kit, GE Healthcare) de acordo com o protocolo do fabricante, sendo dividida em quatro etapas: (i) extração; (ii) DNA Binding, (iii) lavagem e (iv) eluição. Outra possibilidade é a utilização de um método descrito por Lambertini *et al.* (2013).

Nested PCR

A realização da técnica de nested PCR é formada por dois ciclos de PCR utilizando-se pares de *primers* distintos para cada

ciclo. Na primeira reação são empregados os *outer primers*, que no presente estudo foram os *primers* universais para fungos, descritos por White *et al.* (1990), ITS4 (5'-TCCTCCGTTATT-GATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3'), e na segunda etapa os *inner primers* usados foram Bd1a (5'-CAG-TGTGCCATATGTCACG-3') e Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTG-TCCAG-3'), conforme o protocolo de Annis *et al.* (2004). Para ambos ciclos de PCR, para cada reação deve-se preparar uma mistura com volume final de 13 µL, contendo 0,7 µL de cada *primer*, 6,25 µL de GoTaq Master Mix (Promega), 3,35 µL de água ultrapura (Nuclease free, Sigma-Aldrich) e 2 µL de DNA extraído. Um controle negativo de água ultrapura estéril deve ser adicionado à reação para certificar que não houve contaminação. Deve-se adicionar marcadores moleculares de 100 pares de base (pb) (Promega) como um padrão de tamanho de DNA. Além disso, um controle positivo contendo DNA de *Bd* extraído deve também ser empregado.

O perfil de ciclagem para o primeiro ciclo de PCR (ITS4 e ITS5) é a 94°C/5 min, seguido de 30 ciclos na configuração: 94°C/1 min, 60°C/1 min e 72°C/1 min. Após os 30 ciclos, uma extensão final de 72°C/10 min. O produto final do primeiro ciclo de PCR com os *primers* ITS4 e ITS5 é submetido à segunda etapa da técnica. O perfil de ciclagem para o segundo ciclo de PCR (Bd1a e Bd2a) é a 94°C/5 min, seguido de 30 ciclos na configuração: 94°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/1 min, seguidos de uma extensão final de 72°C/10 min. Os produtos da amplificação gerados após os dois ciclos de PCR devem ser analisados em gel de agarose 1% corados com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). As imagens dos géis de agarose são obtidas e visualizadas pelo programa GeneSnap (SynGene) (Figura 2). O resultado é considerado positivo para presença de *Bd* quando forem visualizadas bandas de amplificação de aproximadamente 300 pb.

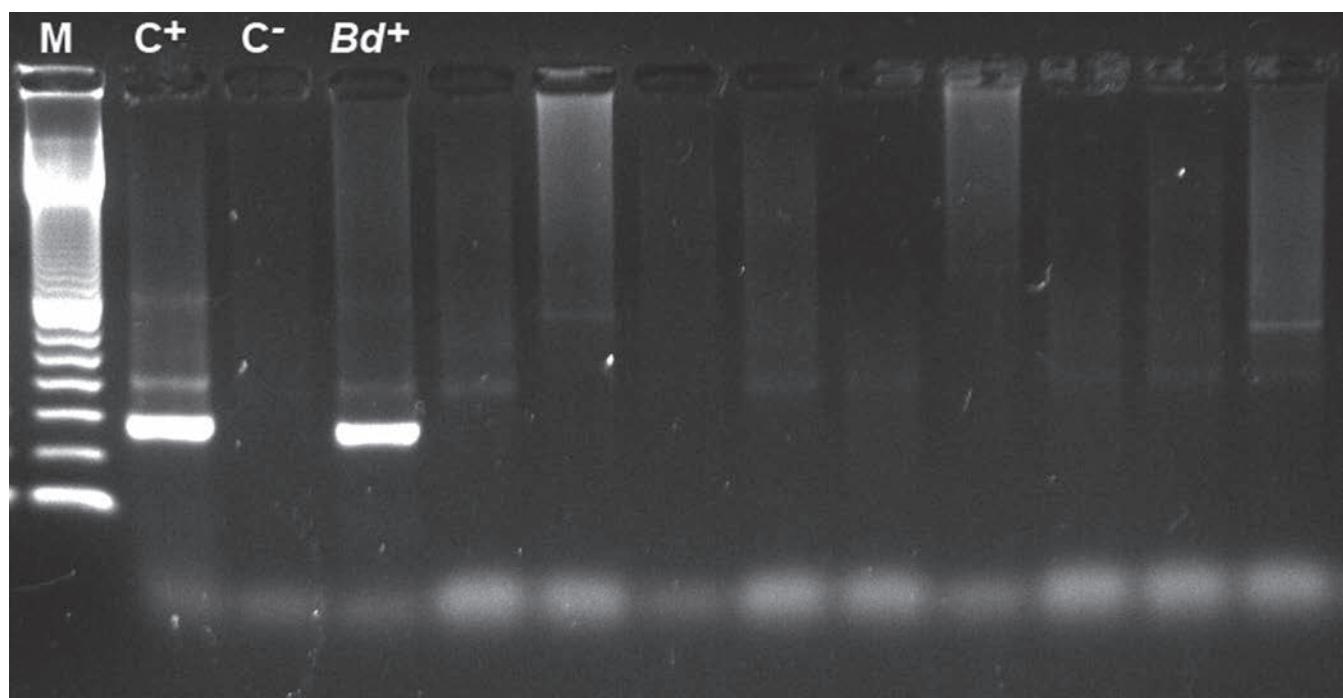


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose, após a amplificação pela técnica de nested PCR. M = marcadores moleculares de 100 pb (Promega); C⁺ = controle positivo para *Bd*; C⁻ = controle negativo; Bd⁺ = amostra positiva para *Bd*; Demais amostras = amostras negativas para *Bd*.

Teste de sensibilidade

Foi realizado um teste de sensibilidade entre as três técnicas de PCR, convencional, nested e real time, com o objetivo de determinar a menor concentração de DNA que cada técnica foi capaz de detectar. Assim, foram realizadas diluições seriadas de DNA de *Bd*, variando de 100 ng/µL a 0,0001 ng/µL. Para realização da técnica de PCR convencional foram empregados os *primers* específicos de *Bd* propostos por Annis *et al.* (2004): Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3') e Bd2a (5'-CATGG-TTCATATCTGTCCAG-3'). Para cada reação foram utilizados 0,7 µL de cada *primer*, 6,25 µL de GoTaq Master Mix (Promega), 3,35 µL de água ultrapura (Nuclease free, Sigma-Aldrich) e 2 µL de DNA, totalizando 13 µL de volume final. As condições da amplificação seguiram o perfil de ciclagem inicial a 94°C/5 min, 30 ciclos: 94°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/1 min e uma extensão final de 72°C/10 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corados com SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). As imagens dos géis de agarose foram obtidas e visualizadas pelo programa GeneSnap (SynGene) e o resultado considerado positivo para *Bd* quando as bandas de amplificação apresentaram aproximadamente 300 pb. Para as reações de qPCR foram empregados os *primers* descritos por Boyle *et al.* (2004) e a amplificação seguiu o protocolo de Lambertini *et al.* (2013). A realização de nested PCR foi realizada segundo descrito acima.

RESULTADOS

A reação de PCR convencional foi a menos sensível entre as três, sendo capaz de detectar 0,1 ng/µL de *Bd*. As reações de qPCR e Nested PCR foram igualmente sensíveis na detecção de *Bd*, detectando 0,0001 ng/µL de DNA do patógeno (**Tabela 1**).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escolha do método utilizado para detecção de *Bd* pode variar de acordo com o objetivo do trabalho. Técnicas moleculares, como o PCR, são bastante sensíveis e capazes de detectar baixas cargas de infecção (Pessier & Mendelson, 2009). Através do teste de sensibilidade realizado no presente estudo, concluímos que o PCR convencional foi bem menos sensível do que as outras duas técnicas, as quais obtiveram a mesma sensibilidade na detecção do fungo.

A maioria dos trabalhos atuais que realizaram a detecção do *Bd* em anfíbios utilizaram a técnica de qPCR (Boyle *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2014; Becker *et al.*, 2015; Lambertini *et al.*, 2016), sendo a utilização do nested PCR mais ocasional (Goka *et al.* 2009; De Paula & Catão-Dias 2011; Coutinho *et al.* 2015). Contudo, a técnica de nested PCR se mostrou igualmente sensível em relação a detecção do patógeno quando comparada ao qPCR, porém, com custo mais baixo. Por outro lado, o nested PCR não é capaz de quantificar a carga de infecção, apenas fornecendo dados de presença ou ausência do *Bd*. Assim, tendo em vista a ampla utilização de métodos moleculares, apresentamos

Tabela 1: Comparação entre os métodos moleculares para diagnóstico de *Batrachochytrium dendrobatidis* incluindo o custo comparativo, a sensibilidade e se o método permite quantificar a carga de infecção.

Método	Custo	Sensibilidade	Quantificação
PCR convencional	\$	10^{-1} ng/µL	Não
Nested PCR	\$\$	10^{-4} ng/µL	Não
qPCR	\$\$\$\$	10^{-4} ng/µL	Sim

aqui uma técnica alternativa pouco explorada, com alta sensibilidade e custo relativamente baixo, a qual pode ser interessante para aqueles que pretendem apenas detectar a presença do fungo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) por conceder bolsa de estudo (#2016/03344-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) por fornecer financiamento e bolsas de estudos (#302589/2013-9; # 300896/2016-6; #405285/2013-2).

REFERÊNCIAS

- Annis, S. L.; Dastoor, F. P.; Ziel, H.; Daszak, P. & Longcore, J. E. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. Journal of Wildlife Diseases, 40:420-428.
- Becker, C. G.; Rodriguez, D.; Lambertini, C.; Toledo, L. F. & Haddad, C. F. B. 2015. Historical dynamics of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amazonia. Ecography.
- Berger, L.; Speare, R.; Daszak, P.; Green, E.; Cunningham, A. A.; Goggin, C. L.; Slocombe, R.; Ragan, M. A.; Hyatt, A. D.; McDonald, K. R.; Hines, H. B.; Lips, K. R.; Marantelli, G. & Parkes, H. 1998. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95.
- Boyle, D. G.; Boyle, D. B.; Olsen, V.; Morgan, J. A. T. & Hyatt, A. D. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis. Diseases of Aquatic Organisms, 60:141-148.
- Coutinho, S. D.; Burke, J. C.; Paula, C. D. de; Rodrigues, M. T. & Catão-Dias, J. L. 2015. The use of singleplex and nested PCR to detect *Batrachochytrium dendrobatidis* in free-living frogs. Brazilian Journal of Microbiology, 46(2):551-555.
- De Paula, C. D. & Catão-Dias, J. L. 2011. Chytridiomycosis: a Devastating Emerging Fungal. Brazilian Journal of Veterinary Pathology, 4(3):250-258.
- Goka, K.; Yokoyama, J.; Une, Y.; Kuroki, T.; Suzuki, K.; Nakahara, M.; Kobayashi, A.; Inaba, S.; Mizutani, T. & Hyatt, A. D. 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distributions, haplotypes and possible route of entry into Japan. Molecular Ecology, 18:4757-4774.
- Hyatt, A. D.; Boyle, D. G.; Olsen, V.; Boyle, D. B.; Berger, L.; Obendorf, D.; Dalton, A.; Kriger, K.; Hero, M.; Hines, H.; Phillott, R.; Campbell, R.; Marantelli, G.; Gleason, F. & Colling, A. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. Diseases of Aquatic Organisms, 73:175-192.
- James, T. Y.; Toledo, L. F.; Rodder, D.; Leite, D. S.; Belasen, A. M.; Betancourt-Román, C. M.; Jenkinson, T. S.; Soto-Azat, C.; Lambertini, C.; Longo, A. V.; Ruggeri, J.; Collins, J. P.; Burrowes, P. A.; Lips, K. R.; Zamudio, K. R. & Longcore, J. E. 2015. Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. Ecology and evolution, 5(18):4079-4097.

Lambertini, C.; Rodriguez, D.; Brito, F. B.; Leite, D. S. & Toledo, L. F. 2013. Diagnóstico do fungo Quitriðio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Herpetologia Brasileira*, 2:12-17.

Lambertini, C.; Becker, C. G.; Jenkinson, T. S.; Rodriguez, D.; Leite, D. S.; James, T. Y.; Zamudio, K. R. & Toledo, L. F. 2016. Local phenotypic variation in amphibian-killing fungus predicts infection dynamics. *Fungal Ecology*, 20:15-21.

Longcore, J. E.; Pessier, A. P. & Nichols, D. K. 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, 91:219-227.

McCullough, M. J.; DiSalvo, A. F.; Clemons, K. V.; Park, P. & Stevens, D. A. 2000. Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatitidis*. *Clinical Infectious Diseases*, 30:328-335.

Olson, D. H. & Ronnenberg, K. L. 2014. Global Bd mapping project: 2014 update. *FrogLog*, 111:17-21.

Pessier, A. P. & Mendelson, J. R. 2009. A Manual for Control of Infectious Diseases in Amphibian Survival Assurance Colonies and Reintroduction Programs. *Conservation Breeding Specialist Group*, 1-229.

Rodriguez, D.; Becker, C. G.; Pupin, N. C.; Haddad, C. F. B. & Zamudio, K. R. 2014. Long-term endemism of two highly divergent lineages of the amphibian-killing fungus in the Atlantic Forest of Brazil. *Molecular Ecology*, 23:774-787.

Vieira, C. A. & Toledo, L. F. 2012. Isolamento, cultivo e armazenamento do fungo quitriðio: *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Herpetologia Brasileira*, 1:18-19.

White, T. J.; Burns, T.; Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1):315-322.



Bothrops atrox, Cacoal, RO. Foto: Paulo Bernarde.