Diagnóstico do fungo Quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*

Carolina Lambertini[1,2], David Rodriguez[3], Fábio B. Brito[4], Domingos da Silva Leite[2], Luís Felipe Toledo[5]

[1] *Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil. E-mail: lambertini.carol@gmail.com*
[2] *Laboratório de Antígenos Bacterianos, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Rua Monteiro Lobato, s/n, Cidade Universitária, 13083-862, Campinas, SP, Brasil.*
[3] *Department of Ecology and Evolutionary Biology, Cornell University, Ithaca, NY, 14853, USA.*
[4] *Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas. Rodovia Municipal Bom Jesus, Viana, km 01, Planalto Horizonte, 64900-000, Bom Jesus, PI, Brasil.*
[5] *Museu de Zoologia "Prof. Adão José Cardoso", Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Rua Albert Einstein, s/n, Cidade Universitária, 13083-863, Campinas, SP, Brasil. E-mail: toledolf2@yahoo.com*

Dado o impacto deletério que a quitridiomicose impõe sobre populações naturais de anfíbios ao redor do mundo, o estudo do fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) está crescendo exponencialmente. Isto é observado não só nos países onde foram relatados declínios e extinções, mas também no Brasil, onde ainda poucos estudos foram concluídos. Portanto, consideramos importante que a comunidade científica brasileira tome conhecimento das diversas técnicas disponíveis para a diagnose do *Bd*. Dentre uma vasta gama de possibilidades, apresentamos neste artigo as principais técnicas atuais, tanto para animais vivos, como para animais fixados, incluindo aqueles depositados em coleções científicas.

Técnicas para animais recém-capturados

1. Identificação visual

A análise visual para detectar a presença de zoosporângios no tecido do aparato bucal de girinos é realizada de acordo com o protocolo de Vieira e Toledo (2012). Observar o aparato bucal dos girinos em lupa estereoscópica, identificando aparato bucal sem perda de queratina (Figura 1A) ou se há despigmentação nos dentículos e bico córneo (Figura 1B). É importante ressaltar que o diagnóstico preciso de infecção por *Bd* não deve ser completamente associado à despigmentação do aparato bucal dos girinos, já que tal despigmentação pode ser decorrente da exposição a contaminantes químicos (Boyle *et al.* 2004), baixas temperaturas, ou mesmo devido à metamorfose (Rachowicz e Vredenburg, 2004). Na maioria (mais de 90%) dos casos a despigmentação está associada à infecção (Knapp e Morgan, 2006). Por outro lado, também observamos casos onde não há deformação do aparato bucal, mas através da visualização microscópica foi confirmada a presença de zoosporângios (menos de 10% dos casos).

2. Análise direta em microscópio

A identificação do *Bd* é realizada através da visualização de cortes de tecido do aparato bucal de girinos, e representa a primeira fase do isolamento (ver Vieira e Toledo, 2012), na qual se busca a visualização de zoosporângios presentes nos tecidos. Deve-se então matar o girino por decapitação, realizar o corte do aparato bucal do girino, alocá-lo em uma lâmina com uma gota de água destilada (pode ser substituída por água comum, caso não seja de interesse realizar o isolamento *a posteriori*), cortar o tecido com bisturi em pedaços pequenos, cobrir com lamínula e observar ao microscópio óptico em aumento de 400X. A identificação se dá pela visualização de zoosporângios no tecido examinado (Figura 1C).

3. Extração de DNA e PCR convencional

3.1. Coleta de material para análise molecular

Primeiramente deve-se coletar o material micótico dos espécimes de anfíbios. Para tanto, o método mais usual é o *swabbing*, no qual *swabs* (= hastes flexíveis com algodão em uma das pontas; zaragatoas) estéreis, com haste plástica, são passados 5 vezes na região inguinal direita, 5 vezes na região inguinal esquerda, 5 vezes nas membranas (ou região) interdigitais dos membros inferiores direito e esquerdo e 5 vezes nas membranas (ou região) interdigitais dos membros superiores direito e esquerdo de cada indivíduo (Hyatt *et al.* 2007) (Figura 1D). O número e os locais para passagem do *swab* podem ser adequados ao estudo e animal em questão, mas existe uma tendência para esta padronização metodológica. Para evitar contaminação cruzada, cada animal deve ser manipulado com um par de luvas diferente, e os *swabs* devem ser acondicionados em criotubos (tubos criogênicos) de 1,5 mL (secos; mas é possível também armazená-los embebidos em álcool PA) e estocados em Ultrafreezer à -80°C (ou freezer convencional à -20°C) até o momento do uso.

3.2. Extração

Após a coleta do material, a extração de DNA deve ser realizada de acordo com Boyle *et al.* (2004) com algumas modificações descritas a seguir. Adicionar 50 µL do reagente PrepMan ULTRA® (Applied Biosystems) a cada criotubo contendo o *swab*. Agitar os tubos em vortex por 45 segundos, centrifugar por 30 segundos a 12.000 RPM, agitar em vortex novamente por 45

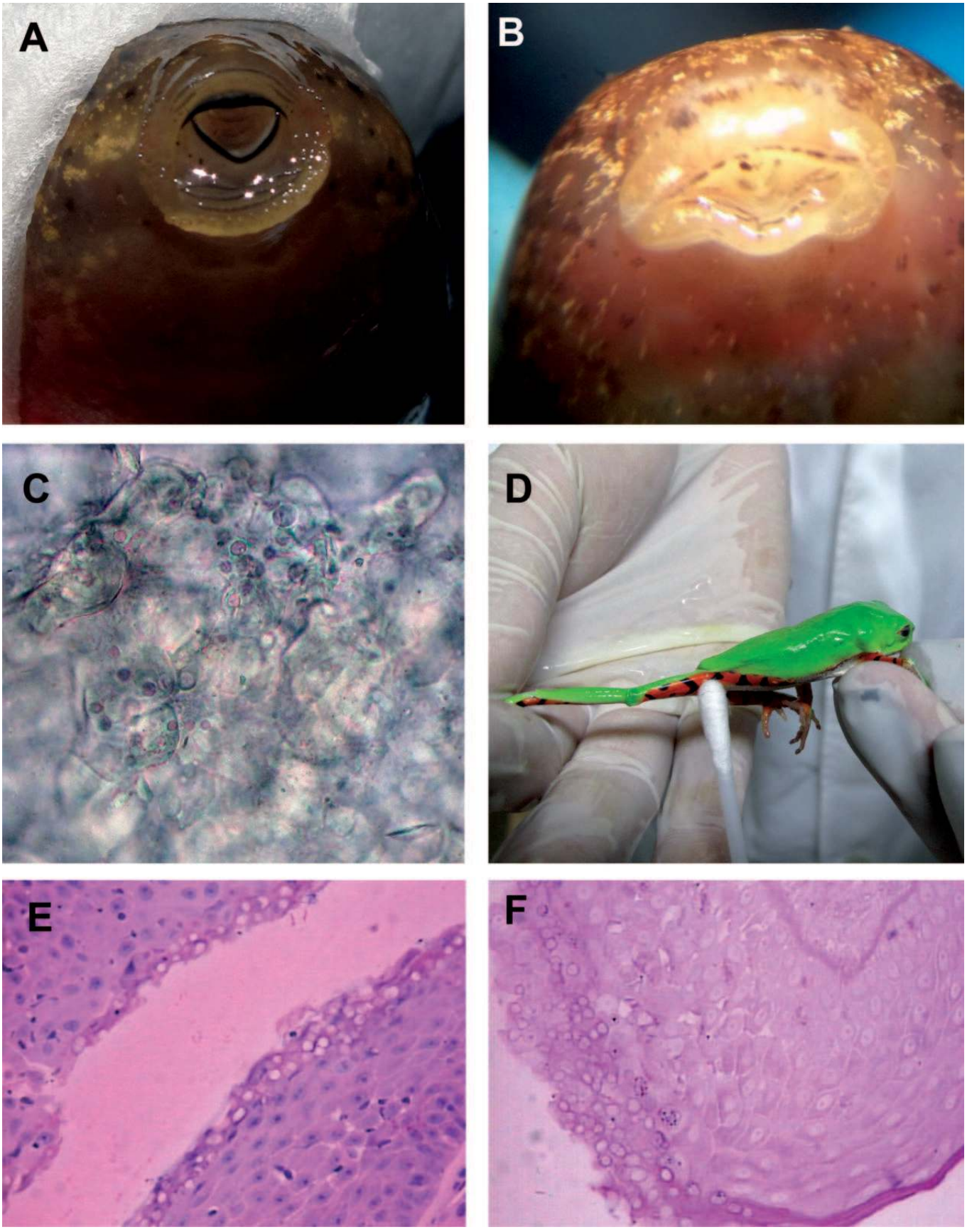

Figura 1: Aparato bucal de girino (*Lithobates catesbeianus*) não infectado (A) e aparato bucal de girino (*Hylodes* sp.) infectado (B); Tecido contaminado com quitrídio, em aumento de 400X, sem corantes (C); *swabbing* na região inguinal de adulto de *Phyllomedusa* sp. (D); tecido corado com H.E. evidenciando a presença de zoosporângios (E); tecido corado por PAS evidenciando a presença de zoosporângios (F).

segundos, centrifugar por 30 segundos a 12.000 RPM, aquecer em banho com água fervente por 10 minutos, resfriar em temperatura ambiente por 2 minutos, centrifugar por 1 minuto a 12.000 RPM, inverter o *swab* dentro do criotubo, utilizando pinças flambadas a cada inversão, centrifugar por 5 minutos a 12.000 RPM, descartar os *swabs,* centrifugar rapidamente (por alguns segundos), transferir 45 µL da solução para novos tubos. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 RPM e preparar uma diluição 1:10 do material genético para estocar (também poderá ser utilizada nas reações de qPCR). Um método alternativo foi descrito por Goka *et al.* (2009).

3.3. Amplificação

A amplificação do DNA é realizada através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), de acordo com o protocolo de Annis *et al.* (2004), utilizando os iniciadores (*primers*) específicos do *Bd:* Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3'), e Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-3'), Para uma reação com volume final de 25 µL, preparar um mix contendo 1 µM de cada primer, $MgCl_2$ (0.9 mM), 1XTaq Buffer, 0.2 mM de cada dNTP e 0.8 U de TaqPolymerase. Um controle negativo de água destilada deve ser adicionado à reação, As condições de amplificação devem ser: denaturação inicial a 93°C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de 45 segundos a 93°C, 45 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a reação de PCR, aproximadamente 10 µL de cada amplificado deve ser analisado em gel de agarose 0,7%, juntamente com um DNA *ladder* como um padrão de tamanho de DNA. O gel deve ser corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz ultravioleta. O resultado é considerado positivo para presença de *Bd* quando forem visualizadas bandas de amplificação de aproximadamente 300 pb.

4. Análise molecular por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para realizar a reação de qPCR, é necessário preparar inicialmente os padrões que serão utilizados como parâmetros no processo de quantificação.

4.1. Suspensão da cultura de *Bd*

Preparar inóculos do *Bd* em placas de ágar Triptona 1% (Longcore *et al.* 1999; Vieira e Toledo, 2012). As culturas devem ser mantidas em estufa à 21°C por aproximadamente 7 dias. Uma vez observada atividade dos zoósporos, adicionar 10 mL de água MilliQ em cada placa e aguardar 30 minutos para que os zoósporos fiquem nadando livres na solução. Após esse procedimento, raspar as placas com alça plástica estéril, e transferir todo o conteúdo para tubos tipo Falcon de 50 mL. Agitar os tubos em vortex por 25 segundos, coletar a suspensão com uma seringa de 20 mL com bico LuerLok® (BD), filtrar a suspensão utilizando filtros de membrana com poros de 10 µm de diâmetro e adicionar o filtrado em outro tubo tipo Falcon de 50 mL.

4.2. Contagem de zoósporos

Este procedimento é realizado para determinar a concentração da suspensão de zoósporos utilizada no preparo dos padrões que serão utilizados na reação. É necessário preparar uma solução v/v com volume final de 100 µL, contendo a suspensão de zoósporos e iodo a 2%. Aguardar 10 minutos para a morte e coloração dos zoósporos. Preencher ambos os lados de um hemocitômetro (câmara de Neubauer) com aproximadamente 10 µL da suspensão e realizar a contagem, na qual deverão ser contados zoósporos presentes em 10 quadrados do quadrante central de cada lado da câmera. Obter a média dos 10 quadrados e cada lado e multiplicar por 25. Multiplicar esse resultado por 10 e multiplicar por 2 devido a diluição com iodo, obtendo assim a média de zoósporos presentes em 1 µL. A concentração pode variar, mas o número de zoósporos da suspensão deve ser 2×10^6 para iniciar a diluição seriada, e a contagem deve ser repetida no mínimo 10 vezes, ou seja em 5 câmaras. Outras metodologias de contagem podem ser conduzidas conforme sua preferência.

4.3. Extração de DNA para os padrões

Após a contagem de zoósporos a suspensão contendo 2×10^6 zoósporos deve ser centrifugada a 12.000 RPM por 10 minutos. Remover o sobrenadante, ressuspender o *pellet* em 100 µL de PrepMan Ultra® (Applied Biosystems), agitar em vortex por 45 segundos, centrifugar rapidamente (alguns segundos), ferver a suspensão durante 10 minutos, resfriar por 2 minutos, agitar em vortex rápido e centrifugar novamente a 12.000 RPM por 5 minutos. Após o procedimento de extração, a suspensão está concentrada a 2×10^4 equivalentes genômicos (abreviado como g.e.; dado que não são mais os zoósporos na sua suspensão e sim o material genético extraído equivalente) em 1 µL ou g.e. μL^{-1}, e será este o *padrão de estoque.*

4.4. Diluição do padrão de estoque

Sabe-se a concentração da suspensão em g.e., agora deve ser realizada a diluição seriada dos padrões para construção da curva padrão. A partir do *padrão de estoque,* com concentração de 2×10^4 g.e. μL^{-1}, deve-se preparar os *padrões de trabalho,* que são diluições seriadas 1:10, iniciando-se com a concentração de 200 g.e. $\mu L^{-1} \times 5$ µL (volume da reação) = 1000 g.e. total na reação (padrão de trabalho 10^3). Deste padrão, as diluições seriadas devem chegar até a concentração de 0,02 g.e. μL^{-1} (padrão de trabalho 10^{-1}). Assim, teremos os padrões de trabalho nas seguintes concentrações: 10^3, 10^2, 10, 1 e 10^{-1} g.e. Após a diluição, deve-se se montar a placa de reação com a primeira fileira contendo 5 µL por poço de cada padrão diluído. O primeiro poço deve conter uma solução padrão 10^3 g.e., seguido dos padrões 10^2, 10, 1 e 10^{-1} g.e. As últimas duas concentrações (1 e 10^{-1}) devem ser adicionadas em duplicata. O último poço deve conter 5 µL de água livre de nucleases como controle negativo.

4.5. Extração de DNA a partir de *swabs*

A extração de DNA segue o mesmo procedimento descrito no item 1.2.

4.6. Reação de qPCR

Para uma placa de 96 poços, deve ser preparado um *"reaction master mix"* contendo: 1250 µL de Taqman Master Mix (Applied Biosystems®), 125 µL do *primer* (Boyle *et al.* 2004) ITS1-3 Chytr (5'-CCTTGATATAATACAGTGTGCCATATGTC-3') concentrado à 18 µM, 125 µL do *primer* 5.8S Chytr (5'-AGCCAAGAGATCCGTTGTCAAA-3') concentrado à 18 µM, 125 µL da sonda ChytrMGB2 (5'-6FAM CGAGTCGAACAAAAT MGBNFQ-3') concentrada à 5 µM, 275 µL de água destilada, e 100 µL de BSA (*Bovine Albumin Serum* / Soro Albumina Bovina). Adicionar 20 µL do mix em cada poço da placa, e adicionar 5 µL do DNA extraído e diluído 1:10 a partir da segunda coluna da placa. Preparar também o controle negativo sem DNA no último poço da primeira coluna da placa, e adicionar os padrões nas diluições 10^3, 10^2, 10, 1 e 10^{-1} g.e. (sendo os dois últimos em duplicata) para a construção da curva padrão nos 7 poços da primeira coluna da placa. A cepa de *Bd* utilizada para a curva padrão deve ser identificada nos estudos, visto que a carga de infecção estimada pela reação de qPCR varia com a cepa (ver Longo *et al.* 2013).

Técnicas para animais preservados

5. Preparação Histológica

Larvas e anfíbios pós-metamórficos podem ser utilizados para investigação da presença do fungo por histologia. Não há informações que relatem a presença dos fungos em desovas. Animais coletados vivos devem ser fixados da maneira tradicional (*i.e.,* fixados em formalina 10% ou paraformaldeído 4%, e conservados em álcool 70%) (Berger *et al.* 2000).

O quitrídio tem afinidade por regiões queratinizadas da pele, assim, no caso de larvas e girinos, a análise deve ser realizada por meio de secções da região oral, onde existe grande concentração de queratina. Já para os espécimes pós-metamórficos, as secções devem ser realizadas nas regiões interdigitais (para anuros e salamandras). Para o preparo das amostras frescas, uma pequena porção do tecido deverá ser transferida para uma solução de formol 10% ou paraformaldeído 4% (preferencialmente tamponados em fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4), por 24 horas (caso o material já esteja fixado, o procedimento poderá ser iniciado no próximo passo). Em seguida, o material deverá ser transferido para uma solução tampão (fosfato de sódio 0,1 M; pH 7,4), onde permanecerá por mais 24 horas (Toledo *et al.* 2006).

O processo de inclusão do tecido poderá ser realizado utilizando-se parafina ou resinas plásticas (historesinas). Para a detecção dos fungos por análise morfológica, recomenda-se o uso de resina, que apresenta maior resolução nas imagens, porém, resultados satisfatórios também são obtidos com o uso de parafina. Assim, após a fixação e banho em tampão, os tecidos deverão ser desidratados, uma vez que a água presente nos mesmos é imiscível a substâncias apolares como parafina e resinas de inclusão. A desidratação deverá ser realizada por meio de imersão numa bateria de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes. A graduação pode ser iniciada a partir de 50% e terminar em álcool absoluto (no caso da parafina) ou álcool 95% (no caso da resina plástica). Recomenda-se que seja utilizada uma bateria de álcoois 50, 70, 80, 90 e 100% (ou 95% para resina), com duração de 30 minutos à 1 hora em cada banho (Toledo *et al.* 2006).

5.1. Inclusão em resina (protocolo descrito para resina Leica®)

Após a desidratação, o tecido deverá ser embebido numa solução de resina com etanol 95% (1:1) durante 4 horas, à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, o material deverá ser embebido em resina pura, por 24 horas, para a perfeita infiltração, sendo mantido resfriado a aproximadamente 4°C. As amostras deverão então ser transferidas para moldes contendo resina com polimerizador (15:1) e mantidas em estufa, a 37°C até a completa polimerização da resina (neste passo, a posição do material deverá ser ajustada para que os cortes sejam realizados na posição desejada). O material deverá, assim, ser seccionado em micrótomo com cerca de 5 µm de espessura e colocado sobre lâmina histológica para a coloração e posterior análise (Berger *et al.* 2000; Toledo *et al.* 2006).

No caso da utilização de outras resinas, o procedimento deverá ser realizado conforme especificações do fabricante.

5.2. Inclusão em parafina

O tecido deverá ser tratado com uma substância de transição. A inclusão em parafina é precedida pelo uso de substâncias químicas como o xilol, que são miscíveis tanto em álcool quanto em parafina. Neste caso, separe 3 banhos de xilol e deixe o material por 40 minutos em cada um. Após a remoção do álcool, o tecido deverá passar por uma infiltração em parafina líquida (ponto de fusão a 56°C), sendo mantido por 4 horas neste meio. O tecido deverá, então, ser transferido para um molde contendo parafina líquida, na posição que será seccionado. Em poucos minutos a parafina endurecerá e obter-se-á, portanto, o "bloco" contendo o fragmento do tecido em seu interior. O material deverá, assim, ser seccionado em micrótomo, com cerca de 5 a 7 µm de espessura, e colocado sobre lâminas histológicas para a coloração e posterior análise. Após a microtomia, o tecido deverá ser tratado novamente com xilol para remoção da parafina e posterior reidratação com o auxílio da bateria de álcoois (agora em concentração decrescente e por cerca de 5 minutos em cada banho), finalizando-se o procedimento com um banho de água.

5.3. Técnica de coloração com Hematoxilina e Eosina (H.E.)

Esta técnica é utilizada para a observação das características morfológicas gerais dos fungos (Figura 1E). Para isso, as

Tabela 1: Comparação das técnicas utilizadas para identificação do *Bd,* incluindo a sensibilidade do método e o custo comparativo (de + a ++++, sendo que "—" indica ausência de custo), informação se envolve ou não a morte e destruição do material (S = sim, N = não), se permite a confirmação da presença/ausência da infecção (S) ou apenas a sua possibilidade (P), e se é um método que permite quantificar a carga de infecção (S = sim, N = não).

Técnica	Sensibilidade	Custo	Morte do animal	Destruição do material	Presença ou ausência	Quantificação
Exame mesoscópico						
Visual	+	—	N	N	P	N
Exames microscópicos						
A fresco	++	+	S	S	S	N
H.E.	++	+	S	S	S	N
PAS	++	+	S	S	S	N
Grocott	++	++	S	S	S	N
Imunoperoxidase	++	++	S	S	S	N
Técnicas moleculares						
PCR animal vivo	+++	+++	N	N	S	N
qPCR animal vivo	++++	++++	N	N	S	S
qPCR animal morto	++	++++	S	N	S	N

lâminas deverão ser hidratadas em água destilada por 1 minuto e mergulhadas em solução de hematoxilina, por 20 minutos. Em seguida, as mesmas deverão ser transferidas para outro banho em água destilada, onde permanecerão por 5 minutos. Após este procedimento, o material deverá ser lavado e mergulhado em solução de eosina por 5 minutos, e, novamente, lavado em água corrente para a retirada do excesso de corante. As lâminas deverão secar em estufa, a 37°C e, em seguida, ser montadas com lamínulas. Neste procedimento, os fragmentos serão protegidos pela cobertura com lamínulas de vidro, sendo esta colada na lâmina através de substâncias selantes como, por exemplo, o Entellan ou Bálsamo do Canadá. Após a secagem (em estufa a 37°C), as lâminas poderão ser observadas ao microscópio de luz.

5.4. Técnica de coloração de PAS (Ácido Periódico de Schiff)

Está técnica é muito utilizada por evidenciar os carboidratos presentes no interior dos fungos, facilitando sua identificação (Figura 1F). Para sua realização as lâminas deverão ser lavadas em água destilada e, posteriormente, coradas em ácido periódico 1%, por 5 minutos. Após nova lavagem em água destilada, as lâminas deverão ser colocadas no reagente de Schiff, à temperatura ambiente, por 15 minutos, protegidas da luz. Em seguida, as lâminas deverão ser lavadas em água corrente, por 10 a 15 minutos (ou até que a coloração fique evidente). Esta lavagem é um passo importante, pois será na reação com água que os corantes evidenciarão sua cor. As lâminas deverão ser secas em estufa e montadas de acordo com a técnica anterior.

5.5. Outros corantes

Além de HE e PAS, também existem outras metodologias de coloração que podem ser empregadas, como por exemplo, a Metenamina de Prata de Grocott para fungos (Nassar *et al.* 2006), onde também é destacada a presença de carboidratos, ou a coloração de imunoperoxidase (Berger *et al.* 2002). Esta última se destaca por ser específica para quitrídios, evidenciando claramente as infecções. Todavia, o uso de anticorpos policlonais faz com que o custo fique elevado. Além disto, ambas são técnicas menos habituais nos laboratórios de histologia. Também é possível combinar diferentes técnicas histológicas, corando diferentes componentes teciduais (ver Olsen *et al.* 2004).

6. Análise molecular

A identificação do *Bd* em animais fixados, depositados em coleções científicas, é realizada através da técnica de qPCR, executada exatamente da mesma forma que a análise em animais vivos.

6.1. Extração de DNA e reação de qPCR

De acordo com a metodologia descrita acima (1.2 e 1.3). Entretanto, o resultado não pode ser utilizado como dado quantitativo, somente como presença e ausência, dado que o método perde sensibilidade e existe possibilidade de contaminação cruzada dos animais em vidros de museu (Soto-Azat *et al.* 2009). Para reduzir a contaminação cruzada, lavar os indivíduos com bastante álcool 70% (utilize uma piceta) e esperar eles secarem, antes do *swab*. Utilize luvas diferentes entre os indivíduos também.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos fatores devem ser levados em consideração quanto à escolha da técnica adequada para detecção do *Bd* (Tabela 1). Segundo Pessier e Mendelson III (1999) as técnicas histológicas e identificação visual podem gerar muitos falsos negativos, especialmente quando a carga de infecção é baixa. Além disso, as técnicas histológicas demandam maior tempo de preparação do que as moleculares. Neste caso, recomenda-se utilizar técnicas moleculares (Kriger *et al.* 2006a, b; Hyatt *et al.* 2007), como PCR convencional e qPCR, as quais são muito sensíveis, capazes de detectar pequenas cargas de infecção cutânea, mesmo em animais assintomáticos (Pessier e Mendelson III, 2009).

Outro fator a ser levado em consideração é a necessidade de morte dos animais, especialmente quando espécies ameaçadas,

em declínio, ou raras são analisadas. Diante disso, técnicas não invasivas devem ser escolhidas ao invés das técnicas letais. Mesmo assim, algumas técnicas que indicamos a necessidade de morte dos animais (Tabela 1) podem ser adaptadas. Por exemplo, é possível realizar histologia de dedos amputados de animais vivos (*e.g.,* Penner *et al.* 2013). Porém a chance de detecção destes pedaços de pele é muito reduzida.

Finalmente, esperamos que os protocolos aqui apresentados estimulem e impulsionem estudos de conservação dos anuros Brasileiros.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos Amanda Keller Siqueira e Timoty Y. James por comentários em versões prévias do manuscrito, FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo), NSF (National Science Foundation), e USFWS (U.S. Fish and Wildlife Service) por fornecer financiamento e bolsas de estudos (Processos 2008/50325-5 e 2011/51694-7).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Annis, S.L., F.P. Dastoor, H. Ziel, P. Daszak e J.E. Longcore. 2004. A DNA-based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. *Journal of Wildlife Diseases,* 40:420-428.

Berger, L., R. Speare e A. Kent. 2000. Diagnosis of chytridiomycosis in amphibians by histologic examination. Zoo's *Print Journal,* 15:184-190.

Berger, L., A.D. Hyatt, V. Olsen, S.G. Hengstberger, D. Boyle, G. Marantelli, K. Humphreys e J.E. Longcore. 2002. Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms,* 48:213-220.

Boyle, D.G., D.B. Boyle, V. Olsen, J.A. Mongan e A.D. Hyatt. 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms,* 60:141-148.

Goka, K., J. Yokoyama, Y. Une, T. Kuroki, K. Suzuki, M. Nakahara, A. Kobayashi, S. In Aba, T. Mizutani e A.D. Hyatt. 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Molecular Biology,* 18:4757-4774.

Knapp, R.A. e J.A.T. Morgan. 2006. Tadpole mouthpart depigmentation as an accurate indicator of chytridiomycosis, an emerging disease of amphibians. *Copeia,* 2:188-197.

Kriger, K.M., J.M. Hero e K.J. Ashton. 2006a. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. *Diseases of Aquatic Organisms,* 71:149-154.

Kriger, K.M., H.B. Hines, A.D. Hyatt, D.G. Boyle e J.M. Hero. 2006b. Techniques for detecting chytridiomycosis in wild frogs: comparing histology with real-time Taqman PCR. *Diseases of Aquatic Organisms,* 71:141-148.

Hyatt, A.D., D.G. Boyle, V. Olsen, L. Berger, D. Obendorf, A. Dalton, K. Kriger, A. Hero, H. Hines, R. Phillot, R. Campbell, G. Marantelli, F. Gleason e A. Colling. 2007. Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis. Diseases of Aquatic Organisms,* 73:175-192.

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

Longo, A.V., D. Rodriguez, D.S. Leite, L.F. Toledo, C. Mendoza-Almeralla, P.A. Burrowes e K.R. Zamudio. 2013. ITS1 copy number varies among *Batrachochytrium dendrobatidis* strains: implications for qPCR zoospore estimation of field-collected amphibian skin swabs. *Plos One,* 8(3):e59499.

Nassar, A., M. Zapata, J.V. Little e M.T. Siddiqui. 2006. Utility of reflex gomori methenamine silver staining for *Pneumocystis jirovecii* on bronchoalveolar lavage cytologic specimens: A review. *Diagnostic Cytopathology,* 34:719-23.

Olsen, V., A.D. Hyatt, D.G. Boyle e D. Mendez. 2004. Co-localization of *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin for enhanced diagnosis of chytridiomycosis in frogs. *Diseases of Aquatic Organisms,* 61:85-88.

Penner, J., G.B. Adum, M.T. McElroy, T. Doherty-Bone, M. Hirschfeld, L. Sandberger, C. Weldon, A.A. Cunningham, T. Ohst, E. Wombwell, D.M. Portik, D. Reid, A. Hillers, C. Ofori-Boateng, W. Oduro, J. Plötner, A. Ohler, A.D. Leache e M.O. Rödel. 2013. West Africa – A safe haven for frogs? A sub-continental assessment of the chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*). *Plos One,* 8(2):e56236.

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

Rachowicz, L.J. e V.T. Vredenburg. 2004. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. *Diseases of Aquatic Organisms,* 61:141-148.

Soto-Azat, C., B.T. Clarke, M.C. Fisher, S.F. Walker e A.A. Cunningham. 2009. Non-invasive sampling methods for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in archived amphibians. *Diseases of Aquatic Organisms,* 84:163-166.

Toledo, L.F., C.F.B. Haddad. A.C.O.Q. Carnaval e F.B. Britto. 2006. A Brazilian anuran (*Hylodes magalhaesi:* Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis:* a conservation concern. *Amphibian and Reptile Conservation,* 4:17-21.

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



Phyllomedusa burmeisteri, Caraça, MG (Foto: J. P. Pombal Jr.).