Isolamento, cultivo e armazenamento do fungo quitrídio: *Batrachochytrium dendrobatidis*

Conrado Augusto Vieira[1] e Luís Felipe Toledo[2]

[1] *Laboratório de Antígenos Bacterianos II, Departamento Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP, Brasil.*

[2] *Museu de Zoologia "Prof. Adão José Cardoso", Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Caixa Postal 6.109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: toledolf2@yahoo.com*

Apresentamos aqui o protocolo (adaptado de Longcore, 2000) para isolamento, cultivo e armazenamento do fungo quitrídio, *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*). Cepas de quitrídio *in natura* podem ser obtidas a partir de anfíbios adultos ou girinos, encontrados vivos, moribundos ou mortos. Para tanto, após a coleta dos espécimes, o transporte deve ser feito refrigerado, idealmente a temperatura de transporte não deve ultrapassar 27°C e a pele do anfíbio (quando pós-metamorfoseado) deve permanecer úmida. Girinos e formas adultas aquáticas (*e.g., Pipa* spp.) podem ser transportados na mesma água onde foram coletados. Em adultos, as cepas de *B. dendrobatidis* podem ser isoladas de mudas de pele ou da pele propriamente dita. Em girinos, estas podem ser obtidas mais facilmente a partir dos aparelhos bucais. Neste caso, observações de falta de queratina nas peças do aparelho bucal podem ser indícios de infecção (Figura 1.; Knapp e Morgan, 2006).

Com exceção do isolamento por mudas de pele, os animais devem ser mortos para realizarem-se os procedimentos. O método ideal é a decapitação (tanto para girinos como adultos) devido à intolerância do agente etiológico ao congelamento, ou à produto químicos, incluindo imersão em solução de álcool, anestésicos cutâneos, inalação de CO_2 ou vapor de éter.

Para os procedimentos descritos neste protocolo, será necessário o preparo dos seguintes meios de cultura:

a) mTGh: 10 g triptona, 10 g Agar, 1.000 ml água destilada, adicionar 200 mg/l penicilina-G e 200-500 mg/L sulfato de estreptomicina (depois de autoclavado).
b) Agar 1% Triptona: 10 g triptona, 10 g de Agar, 1.000 ml água destilada.
c) Caldo 1% Triptona: 10 g triptona, 1.000 ml de água destilada.
d) MIX de criogenia: 10% de glicerol, 10% DMSO, 10% Soro fetal bovino, 1,3% leite em pó, 68,7% caldo nutriente com *Bd*.

ISOLAMENTO

Com auxílio de agulhas e bisturi estéril, colete pequenas porções de pele da região interdigital dos membros inferiores e inguinal dos anuros adultos. Para girinos, recomendamos as peças bucais, tanto as fileiras de dentículos como os bicos córneos. Certifique-se que a amostra mantenha-se úmida (prefira água destilada estéril).

Corte as peças em quadrados de aproximadamente 2 mm^2 e as monte em lâmina. Posteriormente, adicione uma pequena quantidade de água destilada. Cubra com lamínula e observe o material em microscópio (melhor visualização em 400x). Para a constatação da infecção, observam-se estruturas globulares, desprovidas de coloração nas camadas mais superficiais da pele (Figura 1). Devido ao risco de ressecamento, mantenha as amostras sempre úmidas e evite longa exposição à luz do microscópio.

Transfira os quadrados de pele para placa de Petri contendo meio Ágar 1% Triptona. Com auxílio de agulha estéril, friccione os dois lados da peça ao longo da extensão transversal da placa contendo o ágar, por quatro vezes. A placa pode ser utilizada para a raspagem de cinco pedaços em media e posteriormente deve ser descartada. Utilize sempre uma porção limpa do ágar.

Transfira os pedaços de pele para uma nova placa com Ágar mTGh. Mantenha equidistância entre as peças. Marque no fundo de cada placa a posição da pele para melhor monitoramento das culturas. Rotule e envolva a placa com Parafilm®.

Inverta e incube entre 11 e 21°C (dependendo da velocidade de crescimento desejada), analisando diariamente o crescimento. Caso seja observado o desenvolvimento de hifas de fungos filamentosos, colônias de bactérias, ou qualquer outro contaminante ao redor dos quadrados de pele, retire-os imediatamente com auxílio de um bisturi ou alça de platina aquecida próximo ao bico de Bunsen ou em capela.

Os zoósporos podem ser observados no mesmo dia ou em até 7 dias de incubação. Após este período, caso não observe nenhum zoósporo ou zoosporângio, é improvável que haja algum isolado no meio de cultura.

CULTIVO

Após o isolamento, o que normalmente leva cerca de 1 ou 2 semanas, as culturas de *Bd* devem ser transferidas assepticamente para placas de Petri contendo Ágar a 1% de Triptona. Incube a colônia entre 11 e 21°C, sendo necessário o repique a cada 8 semanas ou por advento de contaminação no meio.

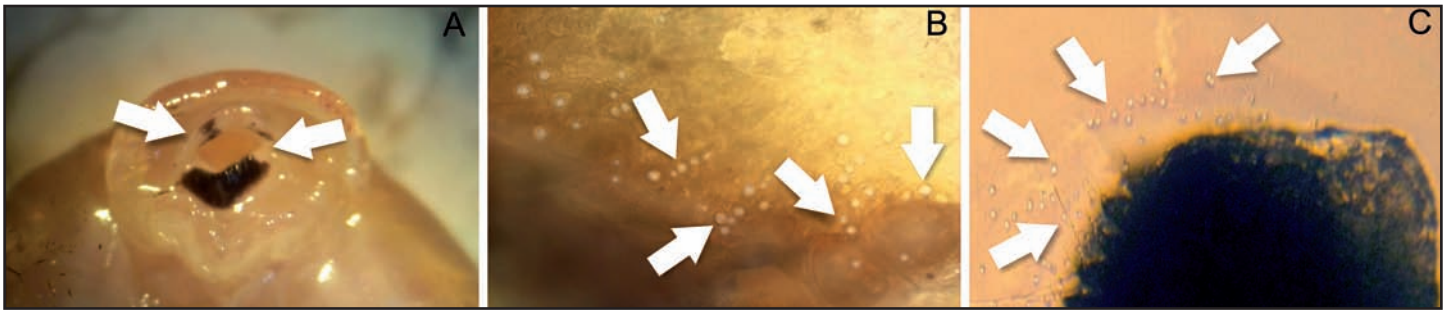


Figura 1: Indícios e evidências de infecção por de *B. dendrobatidis* por diagnostico visual (**A:** setas indicam a perda de queratina nas peças bucais de um girino de *Hylodes ornatus*); citológico (**B:** observação em microscópio em aumento de 400x; setas indicam os zoosporângios) e por isolamento (**C:** cultura em meio mTGh; setas indicam os zoósporos).

ARMAZENAMENTO

Após o isolamento e cultivo, colônias puras de *Bd* podem ser inoculadas para tubos de ensaio inclinados de 30 ml contendo 10 ml de Ágar 1% Triptona em forma de estria simples, ou para maior tempo de armazenamento, em tubos de ensaio contendo caldo 1% Triptona. O quitrídio pode ser acondicionado em temperaturas que variam entre 5 e 25°C por cerca de 4 meses (quando será necessário novo repique).

Os isolados podem ainda ser criopreservados a -80°C conforme Boyle *et al.* (2003). Para tanto é necessário que o *Bd* esteja cultivado em caldo 1% Triptona. Um mix deve ser preparado e adicionado à cultura; pequenas alíquotas de 2 ml em eppendorf são então imediatamente colocadas em biofreezer a -80°C por tempo indeterminado (há relatos de culturas que permaneceram por mais de 10 anos congeladas e ainda puderam ser reativadas). Para a reativação, as alíquotas devem ser imersas em banho maria a 43°C por 45 segundos e inoculados em placa contendo mTGH. O crescimento da cultura é observado em média após 48 h da reativação (pode variar dependendo da cepa).

BIOSEGURANÇA

Ressaltamos aqui que precauções para evitar a transmissão da doença devem ser adotadas. Em campo, durante a coleta, é importante o uso de luvas descartáveis trocadas a cada novo habitat, para evitar a disseminação ou a contaminação cruzada das amostras e dos ambientes. Além disso, recomenda-se o acondicionamento individual dos animais adultos e de lotes de girinos em sacos plásticos descartáveis. As botas de campo podem ser lavadas com detergente e/ou hipoclorito de sódio a 2% entre um sítio de coleta e outro; já foi relatada a presença de esporos na lama em botas de pesquisadores, e os esporos podem sobreviver por cerca de um mês em água (Johnson e Speare, 2003). Em laboratório, todos os materiais que não forem descartáveis devem ser autoclavados antes do descarte ou reutilização. No caso dos girinos, antes do descarte da água dos aquários recomenda-se a adição de 2% de hipoclorito de sódio 12 h antes do descarte, para que zoósporos não possam contaminar os anuros dos corpos d'água que recebem os dejetos do seu laboratório.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao prof. Domingos da Silva Leite pela infra-estrutura disponibilizada e pelo auxílio concedido pela FAPESP (proc. nº 2008/50325-5).

REFERÊNCIAS

Boyle, D.G., A.D. Hyatt, P. Daszak, L. Berger, J.E. Longcore, D. Porter, S.G. Hengstberger e V. Olsen. 2003. Cryo-archiving of *Batrachochytrium dendrobatidis* and other chytridiomycetes. *Diseases of Aquatic Organisms,* 56:59-64.

Johnson, M.L. e R. Speare. 2003. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implications. *Emerging Infectious Diseases,* 2003(8):922-925.

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.

Longcore, J.E. 2000. Recognizing, isolating, and culturing *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. 6 February 2012, http://irceb.asu.edu/amphibians/pdf/IsolatingBatrach.doc.



Caranguejo predando girino de *Hylodes asper,* Picinguaba, Ubatuba, SP. (Foto: M. Martins).