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

Luisa P. Ribeiro[1,2]; Silvio C. Almeida[3]; Jacqueline Kasue Kurissio[4]; João Pessoa Araújo Júnior[4]; Tarsila Franckin[5]; Luís Felipe Toledo[2]; Sandra M. G. Bosco[5]

[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 Tecomarias, 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 populacionas (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

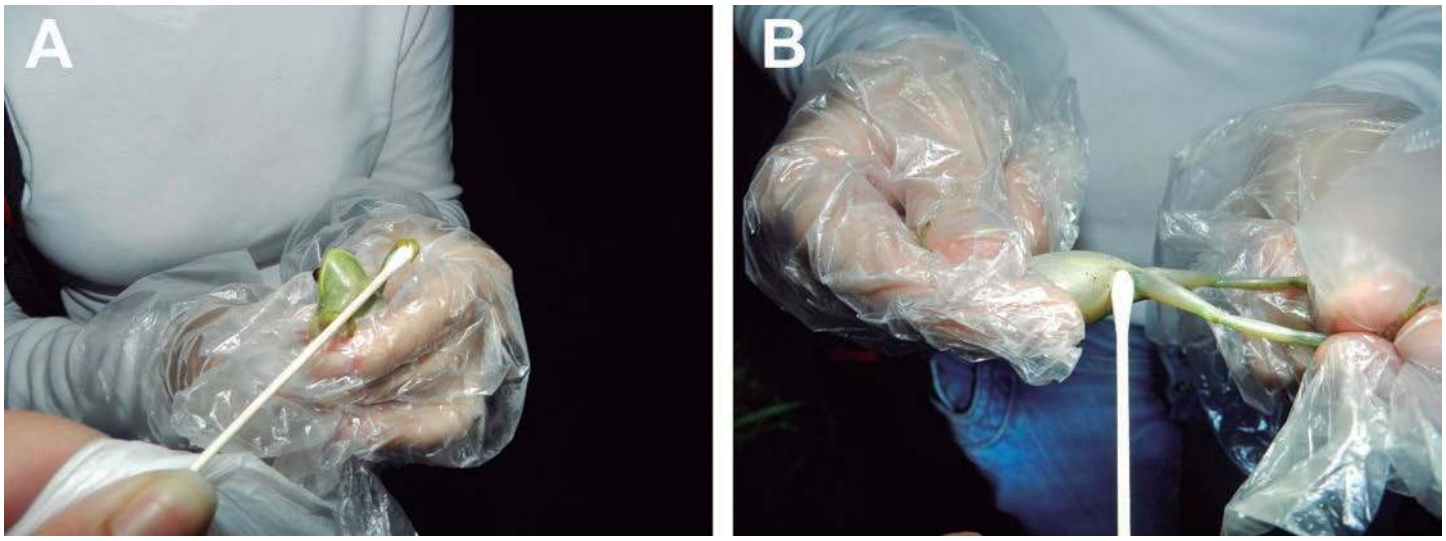


Figura 1: A: *Swabbing* do membro anterior de adulto de *Aplastodiscus perviridis;* B: *Swabbing* da região inguinal de adulto de *Aplastodiscus perviridis*.

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'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), e na segunda etapa os *inner primers* usados foram Bd1a (5'-CAGTGTGCCATATGTCACG-3') e Bd2a (5'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-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.

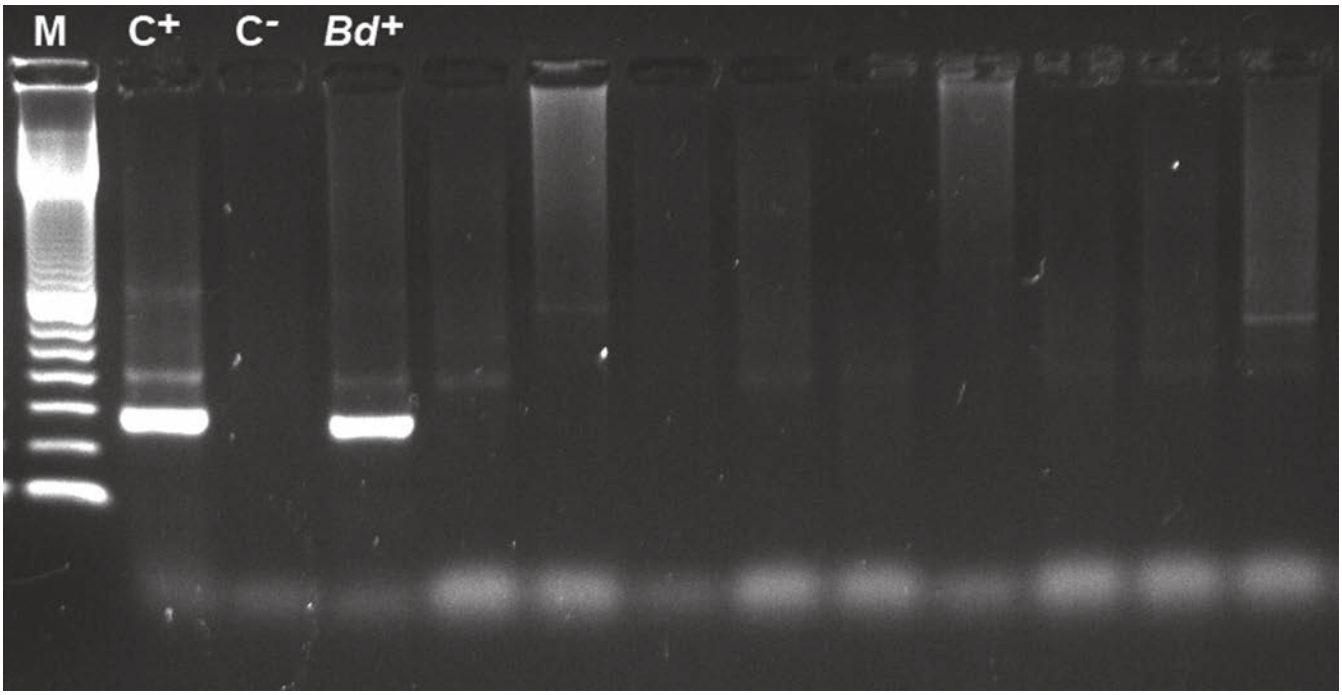


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose, após a amplificação pela técnica de nested PCR. M = marcadores moleculares de 100 pb (Promega); C^+ = controle positivo para *Bd;* C^- = controle negativo; Bd^+ = amostra positiva para *Bd;* Demais amostras = amostras negativas para *Bd.*

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'-CATGGTTCATATCTGTCCAG-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 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.

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

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 Quitrídio: *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 Dideases 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 quitrídio: *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.