CATIA DEJUSTE DE PAULA

Patologia comparada de infecções selecionadas
de anfíbios anuros de vida livre do bioma da
Mata Atlântica: estudo prospectivo

São Paulo

2011

CATIA DEJUSTE DE PAULA

Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica: estudo prospectivo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias

São Paulo

2011

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 031985

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Lin
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
30/6/11

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2468
FMVZ

De Paula, Catia Dejuste

Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica: estudo prospectivo / Catia Dejuste de Paula. -- 2011.

139 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias.

1. Anfíbios. 2. Patologia. 3. Doenças infecciosas. 4. *Batrachochytrium dendrobatidis*. 5. Parasitologia. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica: Estudos prospectivo e retrospectivo", protocolado sob o nº1686/2009, utilizando 150 (cento e cinquenta) anfíbios anuros, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09 de setembro de 2009.

We certify that the Research "Comparative pathology of selected infections in anuran amphibians from the Atlantic Rain Forest Biome: prospective and retrospective studies", utilizing 150 (one hundred fifty) anuran amphibians, protocol number 1686/2009, under the responsibility Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/09/09.

São Paulo, 22 de setembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14555-4

Data da Emissão: 11/09/2009 15:18

Dados do titular

Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues

CPF: 011.275.058-31

Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais

Nome da Instituição: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCENCIAS

CNPJ: 63.025.530/0004-57

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coletas de vertebrados terrestres em diversas localidades em território nacional	02/2008	12/2011
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.			

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Outras ressalvas

1	• As armadilhas de queda deverão ser vistoriadas pelo menos duas vezes ao dia (matutino e vespertino) e possuir mecanismos para minimizar a morte dos animais devido a hipotermia e/ou por afogamento (na época chuvosa), com a colocação de uma camada de isopor ou espuma e furos na base. Também deverão ser retiradas ou permanecer inativas (fechadas), durante os intervalos de amostragem.
2	O pesquisador estrangeiro Agustín Camacho Guerrero está dispensado de autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia. Vinculado a programa de bolsa ou auxílio à pesquisa patrocinado pela CAPES. O pesquisador estrangeiro Craig Charles Moritz está relacionado ao processo CNPq - Expedição Científica (AEX/ASCIN/CNPq 010385/2009-6) e depende de Portaria emitida pelo CNPq/MCT.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Mauro Teixeira Junior	Estudante de Pós Graduação	303.569.738-83	33836684-2 SSP-SP	Brasileira
2	Daniel Michiute Carolino	Estudante de Pós Graduação	283.779.208-08	29017613X SSP-TO	Brasileira
3	Roberto do Val Vilela	Estudante de Pós Graduação	165.927.918-61	14.828.857-1 SSP-SP	Brasileira
4	Maria José de Jesus Silva	Colaborador	103.358.398-78	16647849 SSP-SP	Brasileira
5	José Mário Beloti Ghellere	Estagiário	260.624.908-99	32652843-x ssp-SP	Brasileira
6	José Cassimiro da Silva Junior	Estudante de Pós Graduação	870.773.536-72	M-6.636.360 SSP-MG-MG	Brasileira
7	Renata Moretti	Estudante de Pós Graduação	270.256.528-06	280824683 SSP-SP	Brasileira
8	Helena Nery Alves Pinto	Estagiário	342.950.988-25	44 858 651 - 4 SSP-SP	Brasileira
9	LILIAN DUARTE DE MATOS	Estagiário	301.430.428-07	34820418-8 SSP-SP	Brasileira
10	Rodrigo Marques Lima dos Santos	Colaborador	260.703.698-40	26.129.934-7 SSP-SP-SP	Brasileira
11	Agustín Camacho Guerrero	Estagiario	737.149.251-04	350970E DELEMIG-SP	Estrangeira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 53652878

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14555-4

Data da Emissão: 11/09/2009 15:18

Dados do titular

Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues

CPF: 011.275.058-31

Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais

Nome da Instituição : UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCENCIAS

CNPJ: 63.025.530/0004-57

1	Karen Ventura	Estudante de Pós Graduação	286.798.848-98	29400952-8 SSP-SP	Brasileira
2					
1	Luís Fábio Silveira	Colaborador	884.171.156-68	m5601877 SSP-MG-MG	Brasileira
3					
1	Katia Cristina Machado Pellegrino	Colaborador	128.311.698-79	15649904-6 SSP-SP	Brasileira
4					
1	Renata Cecília Amaro Ghilardi	Colaborador	186.792.798-54	24317317-9 SSP-SP	Brasileira
5					
1	SILVIA RODRIGUES GEURGAS	Colaborador	195.203.428-00	18315095 SSP-SP	Brasileira
6					
1	Tamí Mott	Colaborador	130.907.658-88	25060008-0 SSP-SP	Brasileira
7					
1	Vanessa Kruth Verdade	Colaborador	153.903.938-21	22865266-2 SSP-SP	Brasileira
8					
1	NORALY SHAWEN LIOU	Estudante de Pós Graduação	290.622.598-39	261850763 SSP-SP	Brasileira
9					
2	Sergio Marques de Souza	Estagiário	223.962.268-78	282779590 SSP-SP	Brasileira
0					
2	Marcia Maria Laguna	Estagiário	342.560.748-05	28.774.526-0 SPP-SP	Brasileira
1					
2	Juliana Gusson Roscito	Estudante de Pós Graduação	313.571.618-08	332914215 SSP-SP	Brasileira
2					
2	DANTE PAVAN	Colaborador	140.560.438-76	31076/01 CRBIO-SP	Brasileira
3					
2	Felipe Franco Curcio	Estudante de Pós Graduação	260.593.388-10	24914020-1 SSP-SP	Brasileira
4					
2	Renato Recorder	Estagiário	221.657.568-20	29692720x ssp-SP	Brasileira
5					
2	Pedro Murilo Sales Nunes	Estudante de Pós Graduação	263.459.408-95	24476934-5 SSP-SP	Brasileira
6					
2	Yatiyo Yonenaga Yassuda	Colaborador	219.198.108-97	2830762 SSP-SP	Brasileira
7					
2	Maira Concistré	estagiária	283.945.028-30	30341974X SSP-SP	Brasileira
8					
2	Antonio Mollo Neto	estagiário	361.676.648-62	340959022 SSP/SP-SP	Brasileira
9					
3	Roberta Pacheco Damasceno	colaboradora	948.181.425-49	0753941112 SSP-BA	Brasileira
0					
3	Ana Carolina Oliveira de Queiroz Carnaval	colaboradora	018.737.107-55	08497528-3 IFP-RJ	Brasileira
1					
3	Marco Aurélio de Sena	estagiário	255.521.578-69	24179674-x SSP-SP	Brasileira
2					
3	Craig Charles Moritz	Colaborador			Estrangeira
3					

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		AC	todo o estado	Fora de UC
2		AL	todo o estado	Fora de UC
3		AL	todo o estado	Fora de UC
4		AP	todo o estado	Fora de UC
5		BA	todo o estado	Fora de UC
6		BA	todo o estado	Fora de UC
7		ES	todo o estado	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 53652878

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14555-4

Data da Emissão: 11/09/2009 15:18

Dados do titular

Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues

CPF: 011.275.058-31

Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais

Nome da Instituição: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCENCIAS

CNPJ: 63.025.530/0004-57

8	GO	todo o estado	Fora de UC
9	GO	todo o estado	Fora de UC
10	MA	todo o estado	Fora de UC
11	MA	todo o estado	Fora de UC
12	MA	todo o estado	Fora de UC
13	MT	todo o estado	Fora de UC
14	MT	todo o estado	Fora de UC
15	MT	todo o estado	Fora de UC
16	MS	todo o estado	Fora de UC
17	MG	todo o estado	Fora de UC
18	MG	todo o estado	Fora de UC
19	MG	todo o estado	Fora de UC
20	PA	todo o estado	Fora de UC
21	PB	todo o estado	Fora de UC
22	PB	todo o estado	Fora de UC
23	PR	todo o estado	Fora de UC
24	PE	todo o estado	Fora de UC
25	PI	todo o estado	Fora de UC
26	RJ	todo o estado	Fora de UC
27	RN	todo o estado	Fora de UC
28	RN	todo o estado	Fora de UC
29	RS	todo o estado	Fora de UC
30	RO	todo o estado	Fora de UC
31	RR	todo o estado	Fora de UC
32	SC	todo o estado	Fora de UC
33	SP	todo o estado	Fora de UC
34	SE	todo o estado	Fora de UC
35	SE	todo o estado	Fora de UC
36	TO	todo o estado	Fora de UC
37	TO	todo o estado	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Rodentia, Lagomorpha, Didelphimorphia, Crocodylia, Chiroptera, Amphibia, Chelidae, Emydidae, Kinosternidae, Podocnemididae, Testudinidae, Squamata
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chelidae, Emydidae, Kinosternidae, Podocnemididae, Testudinidae, Squamata, Amphibia, Chiroptera, Crocodylia, Didelphimorphia, Lagomorpha, Rodentia
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera (*Qtde: 5), Crocodylia (*Qtde: 5), Didelphimorphia (*Qtde: 5), Lagomorpha (*Qtde: 5), Rodentia (*Qtde: 5), Amphibia (*Qtde: 15), Podocnemididae (*Qtde: 5), Kinosternidae (*Qtde: 5), Emydidae (*Qtde: 5), Chelidae (*Qtde: 5), Squamata (*Qtde: 15), Testudinidae (*Qtde: 5)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Ovos, Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão
3	Amostras biológicas (Répteis)	Ecdise, Ovos, Regurgitação/conteúdo estomacal, Animal morto ou partes (carcaça)/osso/pele
4	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Armadilha de queda "pit fall", Funil trap, Captura manual
5	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Captura manual, Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Armadilha de queda "pit fall"
6	Método de captura/coleta (Répteis)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Elástico, Captura manual, Armadilha de queda "pit fall"

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 53652878

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14555-4

Data da Emissão: 11/09/2009 15:18

Dados do titular

Nome: Miguel Trefaut Urbano Rodrigues

CPF: 011.275.058-31

Título do Projeto: Sistemática e Evolução de Répteis, Anfíbios e pequenos mamíferos neotropicais

Nome da Instituição : UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCIENCIAS

CNPJ: 63.025.530/0004-57

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo	coleção
2	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCIENCIAS	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 53652878

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: DE PAULA, Catia Dejuste

Título: Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica: estudo prospectivo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: 03/08/2011

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eliane R. Matushime Instituição: FMVZ/USP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: APROVADA

Prof. Dr. Kathleen S. Gago Instituição: Instituto Butantan

Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. MIGUEL TREPANT ROBINHAUI Instituição: IBVSP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. SELENE D.A. COUTINHO Instituição: UNIP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. [assinatura] Instituição: FMVZ-USP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: APROVADO

Aos meus queridos pais,
Alderico e Maria Tereza,
pelo incentivo, apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Luiz Catão Dias pela orientação, aprendizado, apoio, amizade e toda confiança em mim depositada.

Ao prof. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues por todo apoio, aprendizado, viagens de campo e por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa.

Ao Departamento de Patologia pelo apoio e espaço concedido para realização deste projeto, aos funcionários da instituição, aos técnicos do laboratório de histopatologia (Cláudio Arroyo e Luciano A. Bugalho), aos técnicos da necropsia (Raimundo N. Maciel e Edson Luiz de Souza), às secretárias da patologia (Adriana S. Margarido, Milena F. de Oliveira e Maria e Tereza Cristina A. Mário) e da secretária de pós-graduação (Cláudia Lima, Dalva T.V. Alves e Marli C. Ribeiro).

À Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo) pela concessão de auxílio técnico à pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

À Biblioteca e especialmente a Elza Faquim pelas correções da minha tese.

Ao Museu de Zoologia pelas autorizações e apoio nos trabalhos de campo.

À toda equipe e colaboradores do laboratório do Dr. Miguel Trefaut: Ana Carolina Carnaval, Antoine Fouquet, José Cassimiro S. Junior, Márcia, Renata Moreti, Roberta Damasceno, Renato Recoder e especialmente ao Marco Aurélio de Sena e Mauro Teixeira pela ajuda com as viagens de campo, colheita e identificação dos animais, fotos, mapas, solicitude e pelas boas risadas.

À querida Dra Kathleen Grego por todos os ensinamentos com a parasitologia e pela ajuda com a identificação dos parasitas e fotos.

Agradeço ao Laboratório de Biologia Molecular e celular da UNIP em especial à Selene Coutinho, Julieta Burke e Lika Osugui pelos trabalhos com os testes moleculares para Bd.

Agradeço a Christina Ramos e ao Labvet pelos ensinamentos e trabalhos com microbiologia.

Agradeço ao Allan Pessier e Isamara do *Wildlife Disease Laboratories* do *San Diego Zoological Society* pelo envio de material para o diagnóstico de Bd e em especial ao Allan por ter vindo ao Brasil e auxiliar na leitura dos exames histopatológicos e por toda sua paciência e solicitude para ensinar.

À Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima pela amizade, serenidade e bons conselhos

Às minhas grandes e queridas amigas Patrícia Ferreira e Silvia Godoy por toda amizade, cumplicidade, boas risadas e ajuda com o meu projeto.

Ao querido Sérgio Lacerda pelo carinho, compreensão, solicitude, incentivo e essencial ajuda com a capa, fotos, tabelas e formatação.

Às queridas amigas Flávia Miranda e Marina Bueno pelas boas conversas, amizade e ajuda com o meu projeto.

Ao Marco Sena pela foto da capa.

Ao Jorge pela grande ajuda com a organização do Lapcom e com o meu projeto.

Aos amigos e colegas do Lapcom e da patologia pelo convívio, conversas e boas risadas: Alex, Angélica, Cláudia, Fabíola, Gustavo, Katia, Luciana, Marina grande, Marina pequena, Omar, Patrícia, Pedro, Ralph, Renata, Rosely, Samantha, Sávio, Silmara, Stefanie S., Stephanie, Ticiane e Viviam.

Aos meus queridos pais, Alderico e Maria Tereza, e à minha irmã por todo incentivo, ajuda e carinho.

A todos que contribuíram de uma forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

"Só a poesia possui as coisas vivas. O resto é necropsia"

Mário Quintana

RESUMO

DE PAULA, C. D. **Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica**: estudo prospectivo. [Comparative pathology of selected infections of free living anuran amphibians from the Atlantic Forest biome: prospective study]. 139f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os anfíbios apresentaram um severo declínio de suas populações nas últimas décadas. Dentre as diversas causas dos declínios estão as doenças infecciosas. O presente trabalho tem o objetivo de estudar a ocorrência de enfermidades selecionadas que podem acometer estes animais na Mata Atlântica brasileira, e, desta forma, contribuir para a melhor compreensão das conseqüências destas enfermidades para a conservação dos anfíbios em nosso meio. Foram coletados 120 animais da Estação Biológica da Boracéia e realizaram-se exames necroscópicos, histopatológicos, microbiológicos, parasitológicos e PCR convencional para *Batrachochytrium dendrobatidis* em grande parte dos animais. Coletou-se 33 espécies diferentes pertencentes a sete famílias diferentes. Encontrou-se, no exame necroscópico, endoparasitas em 45,8% (55/120) dos espécimes examinados e ectoparasita (sanguessuga) em um espécime. Do total de animais analisados para *Batrachochytrium dendrobatidis*, 19,1% (22/115) foram positivos para Bd. O exame necroscópico assim como o histopatológicos da grande maioria dos animais estudados não exibiu alterações relevantes, sendo que os sistemas mais acometidos foram o digestório e tegumentar seguidos pelos urinário e linfóide. A somatória dos resultados aqui exibidos sugere que, nas condições específicas deste trabalho, os agentes identificados não induziram processos patológicos relevantes, sinalizando uma relação hospedeiro x parasita simétrica. Porém, face ao frágil equilíbrio existente no ambiente da Mata Atlântica e a suscetibilidade dos anfíbios às mudanças dos ecossistemas, cremos que monitoramentos de longo prazo sejam necessários para que se possa acompanhar, com alguma margem de segurança, a evolução desta delicada relação.

Palavras-chave: Anfíbios. Patologia. Doenças infecciosas. *Batrachochytrium dendrobatidis*. Parasitologia.

ABSTRACT

DE PAULA, C. D. **Comparative pathology of selected infections of free living anuran amphibians from the Atlantic Forest biome: prospective study.** [Patologia comparada de infecções selecionadas de anfíbios anuros de vida livre do bioma da Mata Atlântica: estudo prospectivo]. 2011. 139f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Amphibians suffered a severe decline of their populations in recent decades. Among the various causes of the declines are infectious diseases. The present work aims to study the occurrence of selected diseases that can affect these animals in the Brazilian Atlantic Forest, and thus contribute to a better understanding of the consequences of these diseases for the conservation of these animals. We collected 120 animals from the Biological Station of Boracéia and performed necropsy, histopathology, microbiology, parasitology and conventional PCR for *Batrachochytrium dendrobatidis* exams in most animals. We collected 33 different species belonging to seven different families. It was found at necropsy, endoparasites in 45.8% (55/120) of specimens examined and an ectoparasite in only one specimen. Of the total number of animals analyzed for *Batrachochytrium dendrobatidis*, 19.1% (22/115) were positive for this fungus. The necropsy and histopathological exams from the vast majority of animals studied did not show significant changes. The most affected systems were the digestive and integumentary followed by the lymphoid and urinary. The results shown in this work suggests that the infections agents did not induce relevant pathological processes in the specific conditions of this research. However, given the fragile balance of the Atlantic Forest and the susceptibility of amphibians to ecosystem change, we believe that long-term monitoring is needed to follow with some safety margin, the evolution of this delicate relationship.

Keywords: Amphibians. Pathology. Infectious diseases. *Batrachochytrium dendrobatidis*. Parasitology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estação Biológica da Boracéia	67
Figura 2 – Estação Biológica da Boracéia	67
Figura 3 - Mapa de localização da Estação Ecológica da Boracéia e pontos de colheita de animais em vermelho.....	67
Figura 4 - Procura ativa de animais. Foto: Marco Aurélio de Sena.....	68
Figura 5 – Animal coletado em saco plástico. Foto: Angélica Sanchez.	68
Figura 6 – Espécime coletado. Foto: Angélica Sanchez.....	68
Figura 7 – Necrópsia de animal. Foto: Catia D. De Paula.....	68
Figura 8 - Necropsia de animal. Foto: Angélica Sanchez.	68
Figura 9 – Preparação para colheita de exame microbiológico. Foto: Catia D. De Paula.....	68
Figura 10 - Fotografia de resultados positivos para Bd. Números 1 e 16: padrão de peso molecular (100pb); número 2 padrão positivo para B. dendrobatidis; números 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14 e 15: amostras testadas e positivas para B. dendrobatidis; número 13 amostra testada e negativa para B. dendrobatidis. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	73
Figura 11 - <i>Oxyascaris</i> sp. Note os lábios reduzidos sem cápsula bucal (seta branca) e esôfago com ventrículo terminado em bulba glandular (seta preta). Foto: Kathleen Grego.....	78
Figura 12 - <i>Oxyascaris</i> sp. Perceba região anal com pequena espícula (seta). Foto: Kathleen Grego.....	78
Figura 13 – <i>Aplectana</i> sp. Visualize região anal com espícula e presença de diversos ovos no interior da fêmea (seta). Foto: Kathleen Grego	78
Figura 14 - <i>Oswaldocruzia</i> sp. macho. Note a cabeça com dilatação cuticular vesiculosa. Foto: Kathleen Grego	78
Figura 15 - <i>Cosmocerca</i> sp. Perceba a presença de lábios pequenos e um esôfago com curto. Foto: Kathleen Grego	78
Figura 16 – <i>Cosmocerca</i> sp. macho. Observe a pequena espícula em região da cauda. Foto: Kathleen Grego	78

Figura 17 - <i>Ischnocmena guentheri</i> com ausência parcial de membro anterior esquerdo	79
Figura 18 - <i>Rhinella ornata</i> com sanguessuga em região da cabeça.....	79
Figura 19 - Fotomicrografia de pele de <i>Bokermannohyla hylax</i> . Observe a presença de infiltrado linfocitário desorganizando a epiderme (seta). Dermatite linfocitária multifocal. Coloração HE, 200X.....	79
Figura 20 - Fotomicrografia de pele e saco linfático associado (cabeça de seta) de <i>Hypsiboas bischoffi</i> . Visualize a presença de infiltrado granulocítico adjacente à parede do saco linfático (seta). Perilifangite granulocítica. Coloração HE, 100X	79
Figura 21 - Fotomicrografia de fígado e vesícula biliar de <i>Scinax Alter</i> , note a presença de múltiplas estruturas compatíveis com Myxozoário (setas). Coloração HE, 40X.....	79
Figura 22- Fotomicrografia de rim do animal <i>Bokermannohyla hylax</i> . Note a ocorrência de myxozoários no interior de túbulos. Coloração HE, 100x.	79
Figura 23 - Fotomicrografia de bexiga de <i>Hypsiboas pardalis</i> . Perceba a presença de Acanthocephala associado à exsudação inflamatória. Cistite parasitária. Coloração HE, 100X.....	80
Figura 24 - Fotomicrografia de intestino delgado do animal <i>Rhinella sp</i> . Visualize a presença de nematóide com estruturas compatíveis com <i>Oxyurus sp</i> . (seta preta), protozoários ciliados (cabeça de seta preta) e opanilídios (cabeça de seta vermelha). Perceba ausência de resposta inflamatória. Coloração HE, 100X	80
Figura 25- Fotomicrografia de rim de <i>Hypsiboas polytaenius</i> . Observe a presença de granuloma parasitário subcapsular contendo trematóide (seta). Nefrite granulomatosa subcapsular parasitária. Coloração HE, 100X	80
Figura 26 - Fotomicrografia de intestino grosso de <i>Hypsiboas polytaenius</i> . Note a presença de parasita com estruturas compatíveis com <i>Strongyloides sp</i> . embebidos na mucosa intestinal (seta). Coloração HE, 200X	80
Figura 27 - Fotomicrografia de fígado de <i>L. latrans</i> . Note a ocorrência de granuloma com estruturas compatíveis com protozoário (seta) e melanomacrófagos (cabeça de seta). Hepatite granulomatosa parasitária. Coloração HE, 400X	80
Figura 28- Fotomicrografia de pulmão de <i>Bokermannohyla hylax</i> . Observe cortes transversais de nematóides com estruturas compatíveis com <i>Rhabdias sp</i> . Perceba ausência de resposta inflamatória. Coloração HE.....	80
Figura 29- Fotmicrografia do tecido gorduroso de <i>Hypsiboas faber</i> , visualize a alta concentração de tecido gorduroso depletado. Atrofia gordurosa. HE 40X.....	81

- Figura 30 - Fotomicrografia de rim de *L. latrans*. Observe aglomerado de células mononucleares no parênquima renal. Nefrite intersticial mononuclear. Coloração HE, 200X..... 81
- Figura 31 - Fotomicrografia de fígado de *Hylodes asper*. Note grande quantidade de melanomacrófagos (seta) associado a foco de infiltrado inflamatório. Hiperplasia de melanomacrófagos e hepatite mononuclear. Coloração HE, 100X..... 81
- Figura 32 - Fotomicrografia de baço de *Hypsiboas bischoffi*. Visualize a presença de um ninho de células mielóides blásticas (seta). Hematopoiese extra medular. Coloração HE, 400X 81
- Figura 33 - Foto de pele de *Hypsiboas pardalis*. Observe a presença de estruturas compatíveis com *Batrachochytrium dendrobatidis* (seta vermelha) associada a hiperqueratose (seta preta) e hiperplasia de epitélio (cabeça de seta). Coloração HE, 400X..... 81
- Figura 34– Zoosporângio de *Batrachochytrium dendrobatidis* com zoósporos em seu interior. *Physalaemus cuvieri* procedente do Zoo de São Paulo. Coloração HE, 1000X..... 81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Seqüência de iniciadores para identificação de <i>B. dendrobatidis</i>	65
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos animais amostrados em função da Família, espécies, número de espécimes e frequência. Estação Ecológica da Boracéia. N = 120	69
Tabela 2 - Distribuição dos metazoários observados em função da Classe e gênero dos parasitas, localização do parasitismo, número absoluto e frequência de anuros infectados. N = 120	72
Tabela 3 - Distribuição dos resultados positivos para Bd em função da Família e espécie de anfíbio, número absoluto de animais examinados por espécie, número de animais infectados e frequência de positividade. N = 115	74
Tabela 4- Frequência das principais alterações encontradas nos exames histopatológicos em função do número de espécimes analisados de anfíbios anuros da Estação Biológica da Boracéia	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem dos sistemas acometidos por alteração histopatológicas nos anfíbios anuros coletados na estação Ecológica da Boracéia. N = 11476

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Distribuição dos resultados microbiológicos, parasitológicos e molecular para Bd em função da espécie e identificação individual, São Paulo 2009-2010	116
APÊNDICE B - Distribuição dos resultados histopatológico em função das espécies e da identificação individual. São Paulo 2009-2010.....	124

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Distribuição dos parasitas já identificados em anfíbios em função dos locais onde foram encontrados.....	130
ANEXO B - Distribuição dos parasitas já identificados no Brasil em função da espécie, local encontrado no animal, prevalência, número total de animais e referências bibliográficas.....	131
ANEXO C – Identificação de metazoários.....	137

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1	ANFÍBIOS: CLASSIFICAÇÃO, CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E EXTINÇÃO.....	32
2.2	DOENÇAS.....	33
2.2.1	Bacterianas	34
2.2.2	Fúngicas.....	37
2.2.3	Parasitárias	49
2.3	MATA ATLÂNTICA.....	57
3	OBJETIVOS	59
4	MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.1	ÁREA DE ESTUDO.....	60
4.2	COLHEITA DE ANIMAIS.....	61
4.3	EUTANÁSIA.....	61
4.4	NECROPSIA	61
4.5	MICROBIOLOGIA	62
4.6	BIOLOGIA MOLECULAR.....	63
4.7	PARASITOLOGIA	63
4.8	PROCESSAMENTO LABORATORIAL	64
4.8.1	Histopatologia	64
4.8.2	Pesquisa de agentes bacterianos	64
4.8.3	Pesquisa de Bd.....	65
4.8.4	Parasitologia.....	66
4.9	CONSOLIDAÇÃO DOS RESULTADOS	66
5	RESULTADOS.....	69

5.1	ANIMAIS.....	69
5.2	PESQUISA DE AGENTES BACTERIANOS.....	71
5.3	EXAME PARASITOLÓGICO	71
5.4	PESQUISA DE Bd.....	72
5.5	EXAMES ANÁTOMO-PATOLÓGICOS.....	75
6	DISCUSSÃO	82
6.1	ANIMAIS.....	82
6.2	AGENTES BACTERIANOS	82
6.3	PARASITAS.....	84
6.4	BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS (Bd).....	86
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

A perda global da biodiversidade é um dos mais graves problemas da atualidade, sendo alvo de grande preocupação por toda a sociedade. Não se sabe exatamente o número de espécies que já foram extintas, mas é estimada como a maior perda conhecida nos últimos 100.000 anos (ELDRIDGE, 1998). A extensão da perda dessa diversidade biológica e as consequentes alterações na distribuição dos organismos nos diversos habitats apresentam uma considerável variação de acordo com a localização geográfica e características ecológicas e taxonômicas das espécies envolvidas (GARDNER, 2001). Em uma escala global, dentre todos os vertebrados foram os anfíbios que mostraram o mais impressionante declínio nas últimas décadas, processo que aparentemente ainda não cessou (HOULAHAN et al., 2000). Em um estudo realizado por Stuart et al. (2004), verificou-se que 43% das espécies de anfíbios no mundo estão sofrendo algum tipo de declínio, 32,5% estão ameaçadas de extinção e 122 espécies estão possivelmente extintas. A maioria destas perdas ocorreu a partir de 1980 e, particularmente preocupante, as espécies Neotropicais foram as mais afetadas em comparação às existentes em outras regiões do mundo.

Estudos recentes descreveram que o declínio observado em populações de anfíbios é decorrente de interações complexas entre diversos fatores tais como a perda de habitats, introdução de espécies exóticas, poluição, contaminantes ambientais, aumento da radiação UV, alterações climáticas e doenças infecciosas. Muitos destes processos de extinção ocorreram em reservas ou parques naturais altamente preservados. Percebeu-se também que algumas regiões apresentaram-se mais afetadas do que outras e, por motivos ainda desconhecidos, nestes locais algumas espécies foram marcadamente afetadas enquanto outras não. Por conta deste padrão de extinção, acredita-se que não haja uma única causa para o declínio global dos anfíbios (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002).

A preocupação com o declínio de anfíbios está em grande parte ligada ao papel desempenhado por esta Classe de vertebrados como indicadora de estresses

ambientais (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002), uma vez que por suas características fisiológicas, a maioria dos anfíbios apresenta íntimo contato com os ambientes aquático e terrestre nas fases larval e adulta, respectivamente. Além disso, representam importantes componentes dos ecossistemas, onde compõem uma grande parte da biomassa (BLAUSTEIN, 1994).

Há poucas publicações sobre declínios de anfíbios no Brasil, apesar de haver diversos relatos oficiais de espécies outrora abundantes que estão se tornando raras. Essa documentação escassa se dá principalmente devido à falta de dados biológicos sobre as espécies, associado à carência de monitoramentos de curto e longo prazo, aliados à dimensão continental do país e à complexidade e diversidade de espécies de anfíbios e seus habitats. O acelerado declínio das espécies de anfíbios indica a necessidade de uma expansão rápida de programas de pesquisa e estratégias emergenciais para sua conservação, especialmente em locais com pouca informação como o Brasil (SILVANO; SEGALLA, 2005).

As doenças estão entre os diversos aspectos que necessitam ser estudados para o incremento da conservação de anfíbios no mundo e no Brasil. Sabidamente, uma grande variedade de patógenos afeta populações de anfíbios de vida de livre, incluindo vírus, bactérias, parasitas e fungos. Estes agentes podem causar desde alterações fisiopatológicas subletais, com decorrente comprometimento no desenvolvimento populacional, como ocasionarem marcante mortalidade (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002). Os patógenos podem infectar os anfíbios em diversas fases de sua vida. Os dois grupos de patógenos que têm sido incriminados como responsáveis pelo declínio dos anfíbios são o fungo quitrídeo *Batrachochytrium dendrobatidis* e um grande número de ranavirus (KIESECKER; BLAUSTEIN; BELDE, 2001; HARP; PETRANKA, 2006).

Portanto, diante da crise de extinção global que afeta os anfíbios, da importância representada pelo Brasil na composição da rica biodiversidade deste grupo de vertebrados, do relevante papel que as doenças podem ter nos processos de declínio e extinção de populações de anfíbios anuros e o pouco número de trabalhos investigando as enfermidades prevalentes nestes animais no Brasil, o presente trabalho tem o objetivo de estudar a ocorrência de enfermidades selecionadas que podem acometer estes animais em um bioma único de nosso

planeta, a Mata Atlântica brasileira, e, desta forma, contribuir para a melhor compreensão das consequências destas enfermidades para a conservação dos anfíbios em nosso meio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANFÍBIOS: CLASSIFICAÇÃO, CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS, IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E EXTINÇÃO

Os anfíbios compreendem três grupos principais que são as Ordens Anura, Urodela e Gymnophiona. Estes são morfologicamente muito diferentes entre si. Os anuros são especializados em saltar, com patas traseiras bem desenvolvidas, corpos pequenos, ausência de cauda durante a fase adulta e olhos e cabeças grandes. A ordem Urodela é composta por animais mais alongados, com patas dianteiras e traseiras com praticamente o mesmo tamanho e uma cauda longa. A ordem Gymnophiona é composta por animais especializados na vida fossorial, possuem o corpo alongado, ausência de patas e olhos rudimentares (WELLS, 2007).

Apesar dessas diferenças, os anfíbios possuem certas características que os distinguem dos outros vertebrados. São dotados de pele altamente permeável e sem escamas que permite a passagem de água e gases, são ectotérmicos e a maioria depende da água para reprodução. Os ovos não são protegidos por uma casca dura, o que os tornam vulneráveis rapidamente à variação osmótica (WELLS, 2007).

Os anuros compreendem 30 famílias com aproximadamente 350 gêneros e 5.300 espécies em todo o mundo. São morfologicamente bem diversos, ocupando uma grande variedade de ambientes desde poças e riachos de florestas tropicais, até campos de grandes altitudes e desertos. Algumas espécies são estritamente aquáticas, enquanto outras se adaptaram tanto na água como na terra, ou então se especializaram para vida terrestre, subterrânea ou arborícola (WELLS, 2007). No Brasil há 877 espécies de anfíbios conhecidas, sendo que 813 são anuros. Frente a esta biodiversidade, nosso país ocupa a primeira colocação em relação aos países com maior riqueza de espécies de anfíbios, seguidos pela Colômbia e Equador (SBH, 2011).

Muitas das espécies de anfíbios existentes no Brasil foram descritas nos últimos 40 anos. A atual lista brasileira de anfíbios em perigo de extinção possui 15 espécies ameaçadas e uma extinta, todas pertencentes à Mata Atlântica, e mais 19 categorizadas com dados deficientes (IBMA, 2003). Em 2003, o *Global Amphibian Assessment* - GAA, considerou seis espécies como criticamente ameaçadas, seis como ameaçadas, 12 como vulneráveis e uma como extinta, 21 como quase ameaçadas e 205 com dados deficientes (IUCN, 2011). Analisando conjuntamente a lista oficial de espécies ameaçadas do Brasil e aquela do GAA, chega-se a um total de 26 espécies ameaçadas e 01 extinta (SILVANO; SEGALLA, 2005).

A maior parte dos relatos de declínio envolve espécies oriundas da Mata Atlântica (SILVANO; SEGALLA, 2005). Segundo estudo de Eterovick et al. (2005), quatro espécies de anfíbios anuros declinaram no Brasil devido à alteração de seu habitat, enquanto duas desapareceram após desmatamento.

Há também diversas espécies de anfíbios, nativos e exóticos, que são mantidos em cativeiro. A manutenção destas populações tem o objetivo de diminuir o impacto da colheita em vida livre para o consumo humano ou comércio dos animais, manutenção de animais para pesquisas ou programas de conservação *ex-situ*. As principais espécies nesta categoria são a *Lithobates catesbianus* para consumo humano, *Xenopus* para pesquisa biomédica e diversas espécies para programas de conservação (GRIFFITHS; PAVAJEAU, 2008; GARNER et al., 2009). Estes estoques populacionais são, como esperado, suscetíveis a diversas enfermidades infecciosas e não infecciosas e o estudo das doenças nestas populações cativas representa uma importante ferramenta para ampliar o rol de conhecimentos relativos à medicina dos anfíbios (PESSIER, 2008).

2.2 DOENÇAS

Nos próximos segmentos serão apresentadas breves descrições das enfermidades selecionadas, objetos de estudo do presente projeto.

2.2.1 Bacterianas

Muito pouco se sabe sobre a ocorrência de doenças bacterianas em anfíbios de vida livre. Por outro lado, as doenças bacterianas são a principal causa de morbidade e mortalidade em anfíbios de cativeiro. Os agentes envolvidos são aqueles frequentemente encontrados em seu ambiente e a infecção se dá possivelmente devido à queda de resistência, traumas, exposição a substâncias irritantes ou complicações devido a outras doenças infecciosas como micoses ou parasitas (PESSIER, 2007). As bactérias são geralmente Gram negativas (gêneros *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Arizona*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Mima*), mas as Gram positivas, como *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp., também já foram encontradas em lesões sistêmicas e locais. A *Salmonella* sp. é frequentemente isolada das fezes de anfíbios saudáveis, mas também pode ser patogênica. *Leptospira*, *Listeria* e *Rickettsia* também já foram identificadas, mas não relacionadas com doença (CRAWSHAW, 1993; TAYLOR et al., 2001).

A “perna vermelha” é um termo utilizado para descrever doença sistêmica em anfíbios caracterizada por septicemia bacteriana associada a altas morbidade e mortalidade. Os animais apresentam hiperemia, ulceração, edema subcutâneo, vasculite e hemorragia (PESSIER, 2007). A *Aeromonas hydrophila* está comumente implicada, mas não é o único agente. Acredita-se que a combinação de agentes, como os citados anteriormente, é responsável pela doença. (CRAWSHAW, 1993; TAYLOR et al., 2001). Ainda, sabe-se hoje que em alguns casos conhecidos de “perna vermelha”, havia infecção viral primária por ranavírus (PESSIER, 2008). Pasteris, Buhler e Nader-Macias (2006) realizaram estudo microbiológico e histológico de *L. catesbianus* com “perna vermelha”, e isolaram *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e Enterobacteriaceae (*Enterobacter* spp e *Proteus vulgaris*) na pele e água onde os animais estavam. No baço, fígado e sangue observou-se o crescimento de *P. vulgaris*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus*. Nos estudos histológicos das ulcerações de pele observou-se necrose epitelial, disqueratose e apoptose. A derme

apresentou edema, dilatação da luz vascular, exsudato fibrino-leucocitário e distorção das células glandulares e serosas. O fígado apresentou necrose centrolobular e diminuição dos depósitos de melanina nos melanomacrófagos. O baço exibiu infartos sépticos multifocais.

Chlamydophila psittaci e *C.pneumoniae* foram recentemente reportadas em animais de vida livre e cativeiro em um estudo retrospectivo na Suíça (BLUMER et al., 2007). A clamidiose já havia sido descrita em outras espécies, como *Xenopus laevis* e *Mixophyes iteratus* (HOWERTH, 1984; BERGER et al., 1999; BODETTI et al., 2002). Na maioria desses relatos, o diagnóstico foi alcançado através da histopatologia de tecidos fixados em formol e visualização de corpúsculos citoplasmáticos em hepatócitos e células mononucleares fagocíticas esplênicas e hepáticas (PESSIER, 2007). Em um dos relatos, 241 *X. tropicalis*, importados da África para formar uma colônia dos Estados Unidos apresentaram clamidiose e quitridiomiose associadas, com mortalidade de 90%. Exames histopatológicos do fígado de dois animais acometidos por hepatite revelou necrose hepatocelular associada com infiltrado linfohistiocítico e corpúsculos de inclusão em hepatócitos e histiócitos sinusoidais (REED et al., 2000). Em outro caso de clamidiose, em *Mixophyes iteratus* de vida livre, encontrou-se pneumonia mononuclear crônica (BERGER et al., 1999). Deve-se tomar cuidado com a questão zoonótica, pois ainda não se sabe se as cepas de *C.pneumoniae* são capazes de infectar humanos (BLUMER et al., 2007).

As micobacterioses ocorrem esporadicamente e são causadas por diversas micobacterias da água e do solo, como o *Mycobacterium xenopi*, *M. marinum* e *M. renae* (CRAWSHAW, 1993; TAYLOR et al., 2001). A mortalidade geralmente é baixa. Os sinais clínicos são variados e o espectro de lesões varia de discretos nódulos cutâneos, úlceras e celulite a grandes granulomas isolados. As infecções geralmente envolvem a pele, o trato respiratório e os intestinos.

As lesões podem ter aspectos característicos de inflamação granulomatosa, com macrófagos epitelióides ou células gigantes multinucleadas, ou se apresentarem como populações de células relativamente uniformes de pequenos histiócitos. Pode haver aumento da eritropoiese extra medular em órgãos como

fígado e rins (PESSIER, 2007). Os granulomas geralmente contêm um variável número de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR) (SPEARE; BERGER, 2005).

Ferreira et al. (2006) descreveram um surto de micobacteriose devido ao *M. marinum* em uma criação comercial de rã touro (*L. catesbiana*) no Rio de Janeiro. Dez animais apresentaram lesões de pele na cabeça e nas extremidades. Além destes, 38 animais assintomáticos foram eutanaziados e necropsiados. Todos os animais com sinais clínicos e 16 dos assintomáticos apresentaram granulomas disseminados em diversos órgãos como pulmões, fígado, rins, baço, coração, testículos e ovários. BAARs foram observados em 25 dos 26 animais que apresentavam lesões. Verificou-se que o *Mycobacterium* é um importante agente causador de doenças granulomatosa em anfíbios e que os animais infectados, mesmo quando não apresentam sinais clínicos, podem servir como reservatório para as outras espécies. Há outro relato de um surto causado por *M. marinum* em rã touro com animais apresentando anorexia, perda de peso e óbito (BARROS et al., 1988). Os anuros já foram descritos como hospedeiros naturais de espécies de *M. marinum*, relacionados com uma doença granulomatosa não letal em animais imunocompetentes, e como uma doença letal e fulminante em animais imunossuprimidos (RAMAKRISHNAN et al., 1997).

Outra micobactéria, *M. chelonae*, foi isolada de seis *X. laevis* de cativeiro com perda de peso progressiva e lesões ulcerativas na pele que não cicatrizavam (GREEN et al., 2000). *M. gordonae*, já descrito em seres humanos, foi isolado de animais de uma colônia de *X. tropicalis* que apresentaram diversos nódulos cutâneos de variável tamanho e localização. Cortes histológicos da pele mostraram inflamação nodular subcutânea predominantemente composta por macrófagos. Numerosos linfócitos também foram visualizados no infiltrado inflamatório. BAARs estavam presentes nas regiões inflamadas tanto dentro de macrófagos quanto na região extracelular. Esta micobactéria geralmente é considerada um comensal que pode ser encontrado na água e no solo. Acredita-se que a infecção estivesse relacionada a estresse e imunossupressão dos animais (SÁNCHEZ-MORGADO; GALLAGHER; JOHNSON, 2009).

M. liflandii, um *M. ulcerans*-like, foi isolado recentemente em *X. laevis* de vida livre. O agente causou óbito de 70,6% dos animais estudados. Nos exames

necroscópicos observou-se acúmulo de fluído sero-sanguinolento no espaço subcutâneo e/ou na cavidade celomática. Inflamação granulomatosa com BAARs foi encontrada em fígado, pulmão e baço (GODFREY et al., 2007).

2.2.2 Fúngicas

Dentre as doenças micóticas diagnosticadas em anfíbios, a quitridiomicose tem sido a mais estudada e a que tem causado maior preocupação para a conservação de populações de anfíbios de vida livre. Esta enfermidade emergente é causada pelo fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) e infecta uma grande diversidade de anfíbios. A quitridiomicose é considerada como a responsável por diversos declínios e extinções destes animais.

Historicamente, a quitridiomicose foi descrita quando um grande número de anfíbios doentes e mortos foi encontrado durante monitoramentos de populações espécies em Queensland, Austrália, e na América Central. Estudos conduzidos na época não relataram evidências de mortalidade devido a causas ambientais (LAURENCE; MCDONALD; SPEARE, 1996; LIPS, 1998). No geral, os declínios ocorreram em áreas montanhosas, afetando diversas espécies, predominantemente aquáticas (LIPS, 1998). O declínio se deu de forma progressiva, temporal e geograficamente, sendo consistente com quadro epizoótico.

A investigação conduzida descobriu que a causa das mortalidades era uma enfermidade fúngica (BERGER et al., 1998). Ao mesmo tempo, PESSIER et al. (1999) identificaram o mesmo fungo causando mortalidade em dendrobatídeos em cativeiro nos Estados Unidos. A partir deste relato, imagens de um *Dendrobates azureus* falecido no *National Zoological Park* em Washington, DC, USA, foram designadas como a *nomenclatura-tipo* para o fungo. Este foi colocado em um novo gênero, *Batrachochytrium* (Filo: Chytridiomycota, Classe: Chytridiomycetes, Ordem: Chytridiales) (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999), e a enfermidade denominada de Quitridiomicose.

A quitridiomicose é considerada uma doença emergente (DASZAK et al., 1999), e a sua inclusão na lista da Office Internationale de Epizooties (OIE) ressalta a importância desta enfermidade (SCHOEGEL et al., 2010). A quitridiomicose já foi descrita em diversos lugares no mundo: Austrália, Nova Zelândia, Europa, África, Ásia e nas Américas (LIPS, 1998; BERGER et al., 1999; MUTSCHMANN et al., 1999; FELLERS et al., 2001; SPEARE, BERGER, 2001; BRADLEY et al., 2002; LIPS et al., 2004; WELDON et al., 2004; PUSCHENDORF; BALAÑOS, 2006; ALEMU et al., 2008; KUSRINI et al., 2008; UNI et al., 2008; BAI; GARNER; LEE, 2010; KIELGAST et al., 2010). Na América do Sul, além do Brasil, já foi encontrado na Argentina, Chile, Colômbia, Equador, Peru, Uruguai e Venezuela (HERRERA; STECIOW; NATALE, 2005; RUIZ; RUEDA-ALMONACID, 2008; BORTEIRO et al., 2009; BOURKE et al., 2010; CATENAZI et al., 2011).

No Brasil, o Bd foi primeiramente diagnosticado em *Hylodes magalhaese*, um leptodactídeo de altitude que vive próximo a córregos da Mata Atlântica do Brasil. No primeiro relato, foram descritas deformidades bucais de cinco girinos oriundos do município de Camanducaia, MG, e a infecção foi confirmada por dados morfológicos, histológicos e moleculares (CARNAVAL et al., 2005; TOLEDO et al., 2006a). Posteriormente, novos trabalhos envolvendo amostras de 25 espécies de anfíbios depositadas em museus mostraram a presença do fungo em pelo menos cinco outras espécies de Mata Atlântica, incluído *Colostethus olfersioides*, *Thoropa miliaris*, *Hypsiboas freicanecae*, *Crossodactylus caramaschii* and *Bokermannohyla gouveai* (CARNAVAL et al., 2006). Das amostras positivas, a mais antiga era de 01 espécime de *C. olfersioides* coletado em 1981 na Reserva do Tinguá localizada no município de Nova Iguaçu no estado do Rio de Janeiro. No mesmo ano, Toledo et al. (2006b), através de exame histopatológico e morfométrico do fungo, pesquisaram 41 girinos que apresentavam deformidades bucais, colhidos entre 1964 e 2005 em diversos locais do Brasil. Encontrou-se 20 amostras positivas incluindo novas espécies das famílias Cycloramphidae e Hylidae e aumentando a distribuição do fungo para o sul do país. Orrico et al. (2007) encontram girinos de *Hypsiboas latistitriatus* com desqueratinização de discos orais sugestivo de infecção por Bd. Um trabalho com modelagem matemática mostrou que outros biomas brasileiros, como o Cerrado, Pantanal e Amazônia, também podem estar afetados (RON, 2005).

Em animais de cativeiro, o Bd foi identificado em rã touro (*Lithobates catesbianus*) com uma prevalência de 78,5% nos estados de São Paulo e Pará (SCHLOEGEL et al., 2009) e também em espécies nativas de dois zoológicos do Brasil (DE PAULA; ASSIS; CATÃO-DIAS, 2010).

A origem da panepizootia não é conhecida (FISCHER, 2009). Uma das hipóteses é que o agente se espalhou a partir da África para outros locais do mundo. Exame histológico em espécimes de museus identificou um animal positivo colhido em 1938 na África, sugerindo que o Bd se disseminou pelo mundo através do comércio de *X. laevis* (WELDON et al., 2004). James et al. (2009) fizeram análises moleculares nas cepas globais de Bd e encontraram uma maior diversidade genética em Bd isolados na América do Norte do que em qualquer outro local do mundo. No Japão encontraram um animal positivo para Bd coletado em 1902 para um museu. Este dado sugere que o Bd estava presente no Japão por um período anterior a qualquer outra documentação no mundo (FISHER, 2009). Anfíbios com Bd já foram identificados no comércio de animais de estimação, animais com fins científicos, particularmente *X. laevis* e *X. tropicalis*; e animais destinados para alimentação humana, como *L. catesbianus* (WELDON et al., 2004; GARNER et al., 2006).

Espécies como *X. laevis* e *L. catesbianus* podem estar infectados e raramente exibirem sinais clínicos. Infecção experimental de *L. catesbianus* com zoósporos de Bd revelou a ocorrência de lesões focais, com leve espessamento da pele e nenhum sinal clínico de quitridiomíose (DASZAK et al., 2004). Por conta desta baixa ocorrência de manifestações clínicas, acredita-se que o comércio internacional de *L. catesbianus* possa ter sido uma das formas pelas quais o fungo se dissipou para novas áreas geográficas (FISHER; GARNER, 2007; SCHLOEGEL et al., 2009). Além de serem amplamente comercializadas, as rãs touro possuem um grande potencial de invasão nos ambientes (FISHER; GARNER, 2007). A primeira introdução de *L. catesbianus* no Brasil foi em 1930 para um criadouro comercial. A espécie adaptou-se muito bem ao clima do país e, hoje em dia, está presente em dez estados brasileiros vivendo em biomas como a Mata Atlântica e o Cerrado (GIOVANELLI; HADDAD; ALEXANDRINO, 2007).

Corroborando esta hipótese, estudos recentes realizados no país mostraram marcada similaridade entre os isolados de Bd de rã touro de cativeiro, dos animais

introduzidos e das espécies de anfíbios nativos. Esta informação sugere que houve transmissão entre as populações e/ou vieram de uma fonte comum (SCHLOEGEL et al., 2010). Bd também foi detectado em *L. catesbianus* com uma prevalência de 17% em Goiânia, GO, Brasil (GARNER et al., 2006). É importante ressaltar que os dados existentes não permitem afirmar se as rã-touros de criadouros comerciais introduziram o Bd no país, ou foram infectadas por espécies nativas. De qualquer forma, independente da origem, a rã touro parece agir como um reservatório de Bd permitindo a infecção de animais de cativeiro e vida livre. Neste contexto, as práticas de comércio e criação devem ser alteradas para minimizar futuras introduções (SCHLOEGEL et al., 2010).

O ciclo do Bd tem dois estágios principais, ambos assexuados: o zoósporo, móvel, aquático, de curta duração, com função de dispersão; talus monocêntrico, estacionário, que se desenvolve em um zoosporângio (LONGCORE et al., 1999; BERGER et al., 2005) O ciclo de vida parece ser o mesmo em cultura e na pele. A duração do ciclo *in vitro* é de 4 a 5 dias a 22°C e na pele, apesar de não haver pesquisas conclusivas, assume-se que seja o mesmo (BERGER et al., 2005).

Os zoósporos são desprovidos de parede, flagelados, predominantemente esféricos, mas podem ser alongados ou amebóides quando são liberados do zoosporângio. Possuem um tamanho de 3-5 µm com um flagelo (LONGORE et al., 1999). Após um período de motilidade e dispersão, o zoósporo se encista, viabilizando o crescimento de rizóides delicados e ramificados que darão origem ao zoosporângio. O conteúdo dos zoosporângios sofre maturação e clivagem e dá origem a novos zoósporos, que serão liberados no ambiente. Após a liberação dos zoósporos, o esporângio fica vazio, a parede quitinosa pode permanecer ou colapsar. Bactérias podem colonizar os zoosporângios vazios da pele dos anfíbios. Os fungos são geralmente encontrados em aglomerados na pele, exceto em infecções muito severas onde toda a pele ventral pode estar difusamente infectada. (BERGER et al., 2005).

Os esporângios infectam as células do *stratum granulosum* e *stratum corneum* da epiderme superficial. O Bd está bem adaptado a viver na dinâmica tecidual da epiderme estratificada, alojando-se inicialmente no interior das células epidermais das camadas mais profundas. Porém, por possuírem taxas de

desenvolvimento coincidentes com a maturação das células epidermais, à medida que estas se movem para o exterior e se queratinizam, levam junto consigo o fungo. Desta forma, o Bd inicia seu crescimento em células vivas e o completa em células mortas queratinizadas da superfície. (BERGER et al., 2005). A distribuição dos esporângios nos girinos em desenvolvimento segue as alterações de distribuição da epiderme queratinizada (MARANTELLI et al., 2004).

Os zoósporos são o meio principal para dispersão do Bd, mas sua habilidade para infectar o hospedeiro é limitada pelo tempo necessário para o encistamento e pela curta distância que pode deslocar-se. Em água parada, os zoósporos deslocam-se menos de 2cm antes de encistarem, sugerindo que não podem se deslocar por grandes distâncias para encontrarem um hospedeiro. O Bd pode se disseminar de anfíbio para anfíbio por contato próximo ou direto no acasalamento, nos agrupamentos de girinos, ou em outros comportamentos que causem aglomeração dos animais. Por outro lado, acredita-se que se o Bd for atraído por componentes solúveis liberados pela pele, os zoósporos poderiam deslocar-se mais do que o originalmente previsto, favorecendo desta forma a disseminação do patógeno (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE et al., 2004).

Como as temperaturas mais altas aumentam o *turnover* da epiderme e reduzem o crescimento do quitrídio (PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE et al., 2004), especula-se que ambientes mais quentes desfavorecem a dispersão do patógeno, porque o fungo não possuiria tempo hábil para completar o seu ciclo antes da troca da epiderme (BERGER et al., 2005).

As alterações anátomo-patológicas induzidas pela quitridiomicose são, de maneira geral, discretas. As lesões mais comuns são vistas no abdômen ventral, pelvis, patas e dedos. A principal alteração histopatológica é a hiperqueratose da epiderme. Pode haver hiperplasia assim como necrose focal das células da epiderme. Ulcerações ocasionais podem ser vistas associadas a bactérias, em especial nos acúmulos de queratina ou nos esporângios vazios. A inflamação é um achado inconsistente (BERGER et al., 1998, 1999; PESSIER et al., 1999; BERGER et al., 2005).

Clinicamente, os animais infectados podem apresentar descolorações ou vermelhidão na pele, postura anormal, letargia, anorexia, respostas demoradas a

estímulos, convulsões e morte (BERGER et al., 1998). Em girinos é possível observar anormalidades dos discos orais, principalmente despigmentação (BERGER et al., 1999). Algumas espécies podem sobreviver à infecção de forma assintomática, possivelmente servindo como reservatórios da doença (RETALLICK et al., 2004; MCDONALD et al., 2005). Corroborando esta hipótese, sabe-se que populações de girinos de vida livre podem ter uma alta prevalência da infecção (KNAPP; MORGAN, 2006). Infecção experimental em *Rana mucosa* mostrou que os girinos podem ser infectados pelos zoósporos do fungo e transmitirem de um para outro e para os espécimes pós-metamorfos. Os girinos não apresentaram sinais clínicos ao passo que houve óbito de espécimes pós-metamorfos (RACHOWICZ; VREDENBURG, 2004). Girinos de *Bufo boreas* experimentalmente expostos a Bd apresentaram aumento da mortalidade e comportamentos que sugerem que foram afetados pela infecção. No mesmo experimento, girinos de *R. cascadae*, *L. catesbianus* e *Hyla regilla* não apresentaram sinais clínicos ou mortalidade decorrente da infecção, apesar da *R. cascadae* apresentar um aumento da incidência de anormalidades bucais. Os resultados sugerem que a ação patológica do Bd pode ser seletiva, dependendo das espécies acometidas (BLAUSTEIN et al., 2005), enquanto experimentos indicam a possibilidade de diferença de virulência entre os isolados de Bd (BERGER et al., 2005; RETALLICK; MIERA, 2007).

Na outra ponta do processo, aspectos da defesa inata ou adquirida do hospedeiro relacionados com a quitridiomicose ainda são obscuros. Até o momento, não se sabe como o sistema imune de anfíbios, seja o responsável pela resposta celular, seja aquele vinculado à produção de anticorpos, reage à infecção. A habilidade do fungo em replicar no *stratum cornuem* não vascularizado pode fazer com que não seja reconhecido pela resposta imune. Portanto, defesas baseadas em peptídeos antimicrobianos de mucosa podem ser importantes para resistência ao fungo. Neste sentido, é lícito inferir que algumas espécies podem ser mais resistentes do que outras porque possuem peptídeos antimicrobianos mais eficientes (ROLLINS-SMITH; COLON, 2005).

Ainda neste contexto, sabe-se que populações de anfíbios que sofreram declínios associados a quitridiomicose podem se recuperar e persistirem com uma infecção endêmica (WOODHAMS; ALFORD; MARANTELLI et al., 2003; RETALLICK et al., 2004). Como já mencionado, o mecanismo para o

desenvolvimento da resistência adquirida não é conhecido. Há diversas possibilidades para este padrão, como a variação de patogenicidade do fungo, variação na eficiência dos peptídeos antimicrobianos, variação na taxa de troca de pele, história de vida e comportamento. Outra possibilidade é a variação da microbiota cutânea (HARRIS et al., 2006). Diversas espécies de bactérias que vivem na pele de duas espécies de salamandras inibem o crescimento do fungo *in vitro* (SHEAFOR et al., 2008). Efeitos similares podem ocorrer *in vivo* e a microbiota bacteriana pode ter um importante papel na determinação da susceptibilidade da espécie. Outra questão importante é a densidade de bactérias inibidoras e a densidade do fungo patogênico ao qual o animal está sendo exposto (HARRIS et al., 2006).

Há duas hipóteses propostas para explicar como o fungo leva o animal ao óbito. A primeira é a de que o fungo libera enzimas proteolíticas e/ou outros compostos ativos que poderiam causar alterações patológicas; a segunda hipótese é que o dano cutâneo poderia alterar o balanço de eletrólitos, água e oxigênio, levando o animal à morte (BERGER et al., 1998; PESSIER et al., 1999). Em recente e importante contribuição, Voyles et al. (2009) demonstraram em *Litoria caerulea* que o transporte eletrolítico da pele foi inibido em mais de 50% dos animais doentes, as concentrações de plasma, sódio e potássio foram reduzidas e a morte resultou de falência cardíaca assistólica. Em trabalho subsequente, mostrou-se que *Anaxyrus boreas* infectados clinicamente comprometidos apresentavam níveis plasmáticos de sódio e potássio significativamente inferiores aos de animais não infectados (MARCUM et al., 2010).

Uma ferramenta importante para se entender a epidemiologia e o eventual sucesso no controle de uma doença é o desenvolvimento e implementação de testes diagnósticos validados (HYATT et al., 2007). A infecção por quitrídio pode ser diagnosticada por técnicas como histopatologia (BERGER et al., 1998; PESSIER et al., 1999), imunohistoquímica (ELLS et al., 2003), microscopia eletrônica (BERGER et al., 2002), PCR convencional (ANNIS et al., 2004), PCR em tempo real (BOYLE et al., 2004) e *nested* PCR (GOKA et al., 2009). Cada uma destas técnicas será discutida nos parágrafos subsequentes.

Na técnica histopatológica pode-se visualizar o quitrídio no *stratum corneum*. A parede do zoosporângio é lisa tanto na porção interna quanto na porção externa, e uniforme em espessura. O conteúdo do zoosporângio varia de acordo com o estágio de desenvolvimento do quitrídio. No corte histológico podem ser visualizados quatro estágios. O primeiro contém uma massa central basofílica. Esta massa se divide para formar os zoósporos, geralmente de 4 a 10, dependendo do plano de secção. Uma vez que os zoósporos são liberados, o zoosporângio vazio se mantém com a forma esférica. Em alguns estágios vazios há septos finos que podem dividir o zoosporângio em compartimentos internos (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999). O próximo estágio é de colapso do zoosporângio em um formato irregular, e esta estrutura vazia pode ocasionalmente ser colonizada por bactérias. O diâmetro do zoosporângio varia de 6 a 15µm de acordo com o plano de corte. As papilas dos zoosporângios possuem um diâmetro de 2µm e 2 a 4 µm de comprimento. A massa em desenvolvimento dos novos zoosporângios possui um diâmetro de aproximadamente 4-6µm. O tamanho dos zoósporos varia de 1 a 2µm (BERGER et al., 1999; LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999; PESSIER et al., 1999).

Histologicamente, o quitrídio pode ser diagnosticado com a coloração rotineira de HE. Colorações específicas para fungos, como o ácido periódico Schiff (PAS) e colorações de prata podem ser usadas, mas não oferecem nenhum benefício adicional exceto quando há necessidade se confirmar casos onde apenas alguns estágios indistinguíveis estão presentes (BERGER et al., 1999). As técnicas histopatológicas diagnosticam Bd especialmente em casos de infecção severa. Quando a infecção é discreta, é esperado um número significativo de falsos negativos (PESSIER et al., 1999). A probabilidade de o fungo estar presente no tecido examinado está relacionada ao estágio e tempo de infecção, e se a pele infectada ainda está aderida ao fragmento de tecido amostrado (HYATT et al., 2007). Puschendorf e Balaños, 2006, compararam a probabilidade de se encontrar Bd em *Eleuterodactylus fitzingeri* naturalmente infectados utilizando HE e PAS em fragmentos de pele de 12 locais diferentes dos animais. As diferenças de infecção entre as diferentes partes e as amostras de pele da região pélvica e do dedo interno foram significativamente os melhores sítios topográficos para se encontrar o fungo. Os pesquisadores encontraram mais amostras infectadas usando PAS do que HE em todos os fragmentos analisados, mas somente no segmento pélvico a diferença

foi significativa entre as colorações. Mesmo analisando os melhores sítios e valendo-se de colorações apropriadas, em alguns casos mais de 17 cortes foram necessários para haver uma confiança de 95% na detecção do patógeno. Desta forma, recomenda-se que nos exames histológicos sejam analisados um grande número de cortes para minimizar a possibilidade de ocorrência de falsos negativos.

Na tentativa de melhorar a sensibilidade e facilidade dos testes, foram desenvolvidas provas imunohistoquímicas baseadas em anticorpos policlonais e imunoperoxidase. Nestes estudos, o antisoro de todos os animais testados reagiu fortemente com isolados de Bd quando utilizados em ensaios em pele infectada e na própria cultura, nas diluições entre 1:100 e 1:1600. Todos os estágios de Bd foram corados. O antisoro teve reação cruzada com outros fungos, mas nenhum que sabidamente infecte anfíbios (BERGER et al., 2002).

Nesta mesma linha, imunohistoquímica foi utilizada em quatro *Dendrobates tinctorius* infectados experimentalmente. A coloração do tecido positivo foi facilmente visualizada, o que corroborou que esta técnica é uma importante ferramenta diagnóstica auxiliar para o quitrídio, mesmo ponderando a reação cruzada verificada com *Microsporium* sp. (ELLS et al., 2003).

As desvantagens, tanto da histologia quanto da imunohistoquímica são que ambas as técnicas não detectam o Bd nos estágios iniciais da infecção, possuem baixa especificidade, requerem experiência, amostragens expressivas e o uso de corte de dedos no caso dos animais vivos. As vantagens incluem o baixo custo, o potencial de se pesquisar outros agentes infecciosos e a geração de material que pode ser arquivado e utilizado para pesquisas futuras (HYATT et al., 2007). Ainda, trata-se de uma das melhores formas de trabalhar com materiais mantidos em museus, o que permite valiosos estudos retrospectivos (SCHANDER; HALANYCH, 2003).

A PCR convencional foi desenvolvida por Annis et al. (2004). A PCR emprega um par de *primers* que amplifica especificamente a porção rDNA do Bd. Muitas amostras podem ser processadas em um único dia com apenas pouca quantidade de tecido da pele. O par de *primers* Bd1c e Bd2a amplifica consistentemente um fragmento de DNA com 300pb. A detecção limite é de aproximadamente dez

zoósporos. Estima-se que cada zoosporângio produz de 4 a 150 zoósporos, sugerindo, portanto que o teste é sensível mesmo em infecções leves.

A PCR em tempo real (qPCR) é mais rápida e sensível do que a PCR convencional e permite a quantificação do DNA alvo, o que a torna o método ideal de diagnóstico. O teste pode detectar um zoósporo de Bd em tecido de anfíbios infectados. Estudo recente mostrou que em uma amostragem de animais positivos até 15,5% de swabs tinham menos do que 10 zoósporos, o que não seria detectado pela PCR convencional (KRIGER et al., 2008). Ainda, a qPCR é capaz de detectar a infecção de 7 a 14 dias antes da demonstração pelo exame histológico. O DNA fúngico é estável, permitindo o emprego da técnica mesmo em amostras em estado de degradação (BOYLE et al., 2004). Por outro lado, a PCR em tempo real tem um alto custo de processamento. As amostras geralmente são analisadas em triplicata, tornando-o ainda mais caro. É importante ressaltar que a qPCR pode ser inibida por compostos fenólicos, incluindo ácidos húmicos e tanínicos, resultando em falsos negativos. A adição de albumina de soro bovino resultou na diminuição da inibição (GARLAND et al., 2010).

Goka et al. (2009) desenvolveram o *nested PCR* para analisar de forma mais efetiva a sequência do fragmento de DNA amplificado. O *nested PCR* é bom método que possui alta especificidade e sensibilidade para diagnosticar uma região alvo do DNA, mesmo que a amostra esteja contaminada ou degradada como pode ocorrer na colheita de anfíbios de vida livre devido às condições adversas do local de trabalho e do ambiente.

O fungo também pode ser identificado por cultura e isolamento (LONGCORE et al., 1999) mas este requer um grande conhecimento da técnica e tempo. O fungo é sensível a altas temperaturas e, em cultura, sobrevive entre 6°C e 28°C (BRADLEY et al., 2002), mas morre em até 96 horas a 32°C e em 4 horas a 37°C (BERGER et al., 2002). O fungo pode ser cultivado em ágar tGhL (LONGCORE; PESSIER; NICHOLS, 1999; PIOTROWSKI; ANNIS; LONGCORE, 2004). Num experimento, o Bd persistiu por sete semanas e se manteve infectante na presença de matéria orgânica em amostras de água de um lago (JOHNSON; SPEARE, 2003). O Bd sobrevive em água tratada e deionizada por três e quatro semanas, respectivamente (JOHNSON; SPEARE, 2003).

In vitro, o Bd é altamente suscetível a uma série de antifúngicos e peptídeos produzidos na pele (JOHNSON et al., 2003a; ROLLINS SMITH et al., 2005). No entanto, *in vivo* o tratamento apresenta uma eficácia diferente, sugerindo que o Bd pode ser menos suscetível quando localizado na pele do anfíbio (BERGER et al., 2005). O tratamento com banhos de itraconazol a 0,01% por cinco minutos durante 11 dias tem sido usado com sucesso em algumas espécies (PESSIER, 2002; FORZAN; GUNNN; SCOTT, 2008). Este tratamento não deve ser utilizado em girinos ou animais que sofreram metamorfose recente devido à elevada possibilidade da ocorrência de óbitos (PESSIER, 2008). Uma solução comercial de verde de malaquita (0,1mg/litro) e formaldeído (25 p.p.m.) foi eficiente para o tratamento de *Xenopus tropicalis*, mas pode causar deformidades no desenvolvimento (PARKER et al., 2002). Martel et al. (2011) trataram *Alytes cisternasii* e dendrobatídeos com spray de 1,25µg/ml de solução de variconazole por 07 dias e o resultado foi satisfatório para eliminar a infecção dos animais. Apesar das descrições acima, no geral, considera-se que as drogas antifúngicas não foram rigorosamente testadas nos anfíbios (BERGER et al., 2009).

Os tratamentos de suporte incluem a restauração paliativa dos níveis de sódio e potássio sanguíneos pela administração de soluções eletrolíticas. Esta abordagem terapêutica parece ser útil nos casos de animais clinicamente afetados (VOYLES et al., 2009). A temperatura também afeta a quitridiomicose em animais vivos, sendo que temperaturas baixas e flutuantes podem retardar o desenvolvimento da doença, enquanto um curto período de alta temperatura corporal pode eliminar o patógeno do hospedeiro. *Litoria chloris* mantidos em temperatura ambiental de 37°C por menos de 16 horas eliminaram o patógeno, evitando o desenvolvimento da doença. Semelhantemente, espécimes recém-metamórficos suportam de forma satisfatória o tratamento pelo calor (32 a 37°C) e apesar de promissora, ainda é necessário refinamento desta técnica para que possa ser utilizada em um número maior de espécies (WOODHAMS; ALFORD; MARANTELLI, 2003). Aparentemente, altas temperaturas ambientais como as que ocorrem nas terras baixas tropicais ou nos meses de verão podem decrescer a incidência de quitridiomicose em populações de anfíbios e até mesmo eliminar o fungo inteiramente de algumas regiões (WOODHAMS; ALFORD; MARANTELLI, 2003).

Protocolos de desinfecção são essenciais para o manejo da quitridiomicose em cativeiro e no campo. Estes protocolos têm o objetivo de impedir a transmissão do Bd de um local para outro nos trabalhos de campo assim como evitar a entrada do Bd em coleções de anfíbios em cativeiro ou contaminação do ambiente por animais infectados mantidos em cativeiro. Deve-se realizar a desinfecção de todos os equipamentos, botas, veículos, uso de luvas descartáveis para o manuseio de cada animal e em cativeiro a desinfecção de substratos utilizados para os viveiros dos animais ou dos fômites gerados no cativeiro. Um grande número de medidas e desinfetantes químicos alcançam até 100% de eficiência no controle *in vitro* do Bd como, por exemplo, cloridrato de benzalcônio 1mg/ml por 1 minuto, etanol a 70% por 1 minuto, clorexidine 0,75 a 2% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 0,4% por 10 minutos, calor a 60C por 15 minutos ou calor a 30C por 4 horas (JOHNSON et al., 2003a; WEBB et al., 2007; PESSIER; MENDELSON, 2010).

Além da quitridiomicose, há outras enfermidades fúngicas comuns em anfíbios. Como muitas micoses, estes processos geralmente ocorrem secundariamente ao estresse, trauma ou outros fatores que causam imunossupressão (CRAWSHAW, 1993), porém, em alguns casos podem ser a enfermidade primária. O *Saprolegnia* é um importante patógeno encontrado em muitas populações de anfíbios e é o agente etiológico de uma das enfermidades tidas como possíveis de causarem declínio dos anfíbios (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2003). Ainda, a saprolegniose é uma importante enfermidade observada em cativeiro (CATÃO-DIAS et al., 1988) e já foi relatada como causa de mortalidade de ovos de anfíbios em vida livre, tendo sido proposta como a causa do declínio de *B. boreas* e *R. cascadae* nos Estados Unidos (KIESECKER; BLAUSTEIN, 1995; KIESECKER; BLAUSTEIN; BELDE, 2001).

Outras patógenos fúngicos também descritos acometendo anfíbios são os *Rhizopus* spp., *Basidiobolus ranurum*, *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Ichthyophonus* sp., *Candida* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., além dos *Fonsecaea* spp., *Phialophora* spp., *Scolecobasidium humicola* e *Wagniellea dermatidis*, responsáveis por cromomicoses (TAYLOR, 2001). Recentemente, foi relatado um caso de criptococcose pulmonar por *Cryptococcus neoformans* em *B. bufo* em Portugal (SEIXAS et al., 2008).

2.2.3 Parasitárias

Os anfíbios terrestres e aquáticos são hospedeiros de uma grande variedade de parasitas. O anexo A, quadro 1, apresenta uma sumária compilação dos parasitas e principais órgãos onde já foram descritos. De maneira geral, as espécies que infectam os girinos e os anfíbios aquáticos possuem muitas similaridades com parasitas que infectam peixes. Alguns parasitas possuem um ciclo de vida direto, requerendo apenas o hospedeiro anfíbio. Já outros possuem um ciclo indireto, requerendo pelo menos dois hospedeiros e, nestes casos, os anfíbios podem ser tanto o hospedeiro intermediário, albergando estágios imaturos, como final, albergando estágios sexuais maduros (POYNTON; WHITAKER, 2001).

Há trabalhos com descrições de parasitas que acometem anfíbios em vários lugares do mundo como Costa Rica (GOLDBERG; BURSEY, 2010), Peru (MCALLISTER; BURSEY; FREED, 2010a), Nigéria (AISIEN; OGOANNAH; LMASUEN, 2009), Índia (RIZVI; BHUTIA, 2010), Paraguai (MCALLISTER; BURSEY; FREED, 2010b), Guiana (MCALLISTER; BURSEY; FREED, 2010c), Equador (MCALLISTER; BURSEY; FREED, 2010d), Camarões (MCALLISTER; BURSEY; FREED, 2010e). No Brasil, entre os relatos mais recentes, destacam-se os de Boquipani-Freitas et al. (2001); Gonçalves et al. (2002); Luque, Martins e Tavares (2005); Van Sluys et al. (2006); Goldenberg et al. (2007); Smales (2007); Holmes et al. (2008); Santos et al. (2008); Campião e Silva (2009, 2010); Goldenberg e Bursey (2009); Pinhão et al. (2009); Santos e Amato (2010); Velota et al. (2011). Estes dados são apresentados no anexo A, Tabela 5, deste estudo. Quanto à literatura anterior a estas citadas há o uma boa revisão de nematóides de anfíbios do Brasil feita por Vicente et al. (1991).

O trato gastrointestinal dos anfíbios é comumente infectado por ciliados comensais como os *Balantidium*, *Cepedietta*, *Nyctotheroides*, *Tetrahymena* e *Sicuophora*. Estes ciliados possuem um ciclo de vida direto e se reproduzem por fissão binária (POYNTON; WHITAKER, 2001). No ambiente aquático, a pele e guelras de girinos podem ser infectadas por ciliados de trichodinídeos, e as infecções severas podem ser problemáticas devido à lesão causada pelos discos

adesivos de numerosos ciliados. Os sinais clínicos são lesões de pele, excesso de muco e hiperemia das guelras (WRIGHT, 2006). Alguns trichonidídeos, como a *Trichodina urinicola*, podem se alojar na vesícula urinária dos animais, mas estas infecções são raras e acredita-se que não causem lesão nos animais (POYNTON; WHITAKER, 2001). Outros ciliados como *Carchesium* e *Vorticella*, que normalmente são de vida livre, podem colonizar a superfície cutânea de anfíbios aquáticos, especialmente animais jovens ou debilitados, semelhantemente ao o que é observado em peixes (LOM; DYKOVA, 1992).

Além dos protozoários, os anfíbios são hospedeiros de diversos helmintos. O aparecimento de malformações em anfíbios pode estar ligado à infecção pelo trematóide *Ribeiroia ondatrae* (JOHNSON et al., 2003b). Entre os nematóides já foram descritos *Rhabdias* spp., *Dracunculus* spp., *Foleyella* spp., *Pseudocapillarioides* spp., *Aplectana* spp., *Cosmocerca* spp., *Cosmocercoides* spp. e *Capillaria*. Van Sluys et al. (2006), descreveram pela primeira vez a existência de um nematóide (*Cosmocerca ornata*) no intestino de 66,4% de 119 espécimes de *Chiamocleis capixaba* de vida livre do sul do estado da Bahia, sem causar lesões associadas. O trabalho não descreve a presença de lesões no intestino associado ao parasita.

O papel patogênico desempenhado pelos nematóides é questionável. As doenças causadas por este grupo de helmintos são comuns em cativeiro, mas em vida livre não há relatos de declínios causados por estes organismos. De maneira geral, considera-se que os anfíbios possuem uma baixa diversidade de helmintos e baixos níveis de infecção quando comparados a outros vertebrados. Isto pode se dar por especificidade ou aspectos biológicos dos hospedeiros (SPEARE; BERGER, 2005). *Rhabdias* spp. são os parasitas pulmonares mais comuns em anfíbios. Possuem um ciclo de vida direto onde a larva penetra a pele do animal, sofre muda, desloca-se até os pulmões e atingem as vias aéreas superiores para serem deglutidas e eliminadas nas fezes. Uma infecção severa pode causar alterações patológicas importantes (WRIGHT, 2006). Infecção experimental por *R. bufonis* em *B. bufo* resultou em diminuição do crescimento, comprometimento do estado geral e mortalidade. *B. marinus* exposto a larvas infectantes de *R. sphaerocephala* vieram a óbito de forma aguda, com extenso comprometimento por conta da presença de grande número de larvas em diversos órgãos e tecidos, incluindo musculatura

cardíaca, fígado e olhos. Ainda, larvas de *Rhabdias* podem chegar aos pulmões indiretamente pela corrente sanguínea, ou por migração direta, quando alguns podem se encistar em órgãos causando granulomas (SPEARE; BERGER, 2005). Em estudo experimental para investigar a sensibilidade de *R. sylvatica* à infecção pela *Rhabdias ranae*, observou-se que os machos eram mais importantes como fonte de estágios infectantes do que a fêmea (DARE; FORBES, 2008). Em investigação toxicológica ambiental, espécimens juvenis de *R. pipens* expostos a seis pesticidas (atrazina, metribuzina, aldicarb, endossulfan, lindano e dieldrin) foram infectados por *R. ranae* e tiveram uma prevalência maior deste parasita do que o grupo controle, sugerindo que estes pesticidas podem alterar a resposta imune destes animais e causar variações nas prevalências do parasita (CHRISTIN et al., 2003).

Strongyloides spp. é um helminto de ciclo de vida direto responsável por causar lesões gastrointestinais em anfíbios parasitados. *Foleyella* spp. pode causar óbito devido à severa infecção assintomática por microfilárias ou parasitas adultos. *Pseudocapillaroides xenopi* é um nematóide vascular que se aloja na epiderme do animal e promove úlceras, descamação epidérmica, eritema e perda de peso após quatro meses de infecção (SPEARE; BERGER, 2005).

Em anfíbios, a maior parte das infecções causadas por cestóides e trematóides envolve a fase larval, uma vez que os anfíbios frequentemente são hospedeiros intermediários dos ciclos destes parasitas. Nesta circunstância, os processos parasitários costumam ser brandos e localizados e com o encistamento dos parasitas. Porém, infecções importantes, com alterações clínico-patológicas relevantes, podem ocorrer quando há extensas migrações larvais. Ainda, adultos de trematóides podem ser encontrados nos pulmões, vesícula biliar, rins, trato gastrointestinal e pele.

Além dos processos acima mencionados, pesquisas recentes têm investigado o trematóide *Ribeiroia* sp. e sua relação com malformações em *Bufo boreas* (KLAPHAKE, 2009). As malformações podem atingir uma alta porcentagem dos anfíbios (>25%) em uma população e podem causar uma diminuição das chances de sobrevivência dos animais (SESSION; RUTH, 1990). Jonhson et al. (2003) fizeram uma revisão em museus sobre malformações em espécies de nove regiões

dos EUA e retornaram aos locais onde tais espécies foram coletadas para verificar se ainda havia a ocorrência de malformações. Identificaram que as más formações de seis dos nove locais foram causadas por metacercárias de *Ribeiroia* sp., sendo o relato mais antigo de 1946. Dos seis locais que ainda tinham anfíbios, 03 possuíam animais com severas deformidades de membros numa frequência de 7% a 50% em uma ou mais espécies. Não foram encontrados pesticidas. Estes resultados sugerem que a *Ribeiroia* historicamente foi uma importante causa de malformações em anfíbios, havendo evidências quantitativas sugerindo que sua presença vem aumentando nos últimos anos. *R. onodeiria* e *E. trivolvis* ocorrem em ambientes aquáticos lânticos e infectam o intestino de diversas espécies de vertebrados, tipicamente aves e mamíferos aquáticos ou semi-aquáticos. Possuem um ciclo de vida complexo necessitando infectar três diferentes hospedeiros, incluindo caramujos, girinos ou peixes e aves ou mamíferos. As cercárias infectam os girinos e se encistam geralmente na base das patas traseiras, evoluindo para metacercárias. As metacercárias são liberadas dos tecidos quando os hospedeiros definitivos (aves e mamíferos) ingerem os girinos (JOHNSON; CHASE, 2004). *E. trivolvis* encistam no sistema renal em desenvolvimento causando diminuição do crescimento e óbito. Portanto, estes parasitas podem ter grandes impactos negativos nas comunidades de anfíbios, principalmente de girinos em estágios iniciais (SCHOTOEFFHER; LABAK; RAFFEL, 2007). No exame histopatológico pode-se observar no rim de girinos e nos membros de adultos a formação de granuloma ou tecido fibrótico ao redor das metacercárias de *Echinostoma* (HOLLAND et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais as malformações decorrentes de parasitismo ocorrem são ainda controversos. Há dois mecanismos propostos. O primeiro sugere que as metacercárias encistam em tecidos do broto germinativo dos membros, causando ruptura mecânica da organização espacial das células e levando a um crescimento celular anormal. O outro mecanismo seria causado pelo próprio parasita, que produz ou libera fatores de crescimento que confundem os sinais moleculares para desenvolvimento dos membros (SZUROCZKI; RICHARDSON, 2009). Ainda, acredita-se que fatores estressantes, tais como presença de herbicidas ou fertilizantes, aumento de radiação UVB, aumento dos hospedeiros intermediários primários (caramujos) ou diminuição dos locais para os girinos se esconderem, possam favorecer o (KISECKER; BLAUSTEIN; BELDE, 2001).

Nesta linha de abordagem, sabe-se que muitos pesticidas e outras substâncias químicas às quais os anfíbios são expostos podem aumentar os problemas com trematóides. Exposição de embriões de *R. palustres* ao organofosforado malation causou aumento do encistamento de *E. trivolvis*, associados à diminuição da taxa de eclosão e aumento da incidência de malformações (BUDISCHAK; BELDEN; HOPKINS, 2008). O uso do herbicida atrazina causou aumento da infecção por trematóides em *R. pipens*. A combinação de atrazina e fosfato, substâncias que são amplamente utilizadas na agricultura, causou um aumento de 74% destes parasitas (ROHR; SCHOTTHOEFER; RAFFEL, 2008). Girinos de *R. sylvatica* expostos a atrazina tiveram uma maior intensidade de parasitismo do que girinos não expostos a esta substância química (KOPRIVNIKAR; FROBES; BAKER, 2007).

Estudo recente mostrou que 80% a 90% das cercarias de *R. ondatrae* podem ser ingeridas por diversos grupos de invertebrados. Isto reforça a hipótese de que a manutenção da biodiversidade, incluindo predadores invertebrados aquáticos, pode limitar os efeitos adversos dos trematóides em hospedeiros vertebrados (SCHOTTHOEFER; LAMAK; RAFFEL, 2007).

Os anfíbios podem albergar adultos de Acanthocephala em seu intestino, ou podem ser infectados pela forma jovem encistada. Os acanthocephalos possuem um ciclo de vida indireto, requerendo pelo menos um hospedeiro intermediário que geralmente é um crustáceo ou inseto. As espículas existentes na superfície dos Acanthocephala podem causar perfurações, celomite e morte. *A. ranae* é uma espécie comum na Europa, não requerendo um artrópode como hospedeiro intermediário e, em cativeiro, possui comportamento auto limitante (SPEARE; BERGER, 2005; WRIGHT; 2006).

Oligoquetas pertencentes ao gênero *Dero* já foram descritos, parasitando cloaca, bexiga urinária e ductos de Wolff (FRENKEL; HARMAN, 1985; LOPEZ et al., 1999).

Com relação aos protozoários, já foram relatados infectando anfíbios os seguintes gêneros: *Entamoeba*, *Trichodina*, *Costia*, *Oodinium*, *Vorticella*, *Charchestion* spp., *Oodinium* spp., *Trichodona* spp., *Dermocystidium* spp.,

Dermosporidium spp., *Pleitophora* spp, *Isospora* spp, *Eimeria* spp e *Goussia* sp. (CRAWSHAW, 1993; HADFIELD; WHITAKER, 2005; JIRKÚ; MODRÝ, 2006).

Um grupo de crescente interesse de parasitas para os organismos aquáticos é o dos myxozoários, responsáveis pelas myxosporidioses. Acredita-se que estes agentes possam emergir como uma séria ameaça para a reprodução de organismos aquáticos, como os peixes e anfíbios, uma vez que algumas espécies podem se alojar nas gônadas dos animais, levando-os à infertilidade (SITJÀ-BOBADILLA, 2009). Os myxozoários são organismos intracelulares que podem estar localizados nos órgãos internos ou na superfície do corpo dos hospedeiros. Há mais de 2180 espécies conhecidas de myxozoos, parasitando principalmente peixes. Apenas 15 espécies de 06 gêneros foram encontradas em anfíbios: *Myxobolus*, *Myxidium*, *Hoferellus*, *Chloromyxum*, *Caudamyxum* e *Spheorospora*. Estes parasitas localizam-se principalmente nas gônadas, dutos deferentes, ovidutos, rim, bexiga, ureter, vesícula biliar e fígado (EIRAS, 2005). Em um relato de myxosporidiose cutânea em *L. caerulea* na Austrália, o animal apresentou diversos cistos milimétricos, polimórficos, parcialmente cheios de líquido com coloração branco acinzentado e úlceras em consequência do rompimento destes. Microscopicamente observaram-se formas de myxosporídeos contendo numerosos esporos maduros (SZCZEPANIA; TOMCZUK; STUDZINSKI, 2011). Outro myxozoário de potencial interesse para os anfíbios é o *Hoferellus*, descrito em anfíbios anuros da África (MUTSCHMANN, 2004). De maneira geral, acredita-se que a maioria dos myxozoários não sejam patogênicos. Porém, quando ocorrem, as alterações patológicas mais severas costumam estar centradas no fígado e rim (DUNCAN; GARNER; BARTHOLOMEU, 2004; MUTSCHMANN, 1999).

Semelhantemente ao que ocorre com os demais parasitas, os anfíbios são hospedeiros de uma grande variedade de hemoparasitas. Dentre os hemoparasitas descritos estão os tripanossomas. Há mais de 70 espécies de *Trypanosoma* reportados que parasitam anfíbios, no entanto, alguns destes podem ser formas pleomórficas (DRESSER, 2001). Os tripanossomas afetam a maioria das espécies de anfíbios anuros (BARDSLEY; HARMSSEN, 1973). Os tripanossomas dos anfíbios estão classificados em um grupo monofilético denominado clado aquático, sendo primariamente transmitidos por sanguessugas (HAMILTON; GIBSON; STEVENS, 2007). Porém, estes tripanossomas também aparecem em espécies de anfíbios

terrestres, indicando a existência de insetos como vetores (BARTA; DESSER, 1984). No Brasil, tais parasitas já foram descritos em diversas espécies, sendo que o trabalho mais recente foi realizado por Lemos et al. em 2008, onde foi encontrado *T. chattoni*. Há relatos também de parasitismos por *Hemogregarina*, *Hepatozoon*, *Lankesterella*, *Schellackia*, *Babesiosoma* e *Dactyosoma* (POYTON; WHITAKER, 2001).

Hepatozoon spp. (Philo Apicomplexa) é um parasita intraeritrocitário obrigatório de tetrápodes, sendo que já foram descritas mais de 40 espécies em anfíbios anuros em todo mundo (SMITH, 1996). Duas espécies, *H. catesbiana* e *H. clamata* comumente afetam hílídeos da Nova Escócia (BOULIANNE et al., 2007). Os parasitas se desenvolvem nos túbulos de malpígue do hospedeiro definitivo, mosquito *Culex territans*, após estes insetos terem se alimentado do sangue de sapos adultos que carregam gamontes infectantes na circulação sanguínea. A transmissão ocorre quando mosquitos infectados com oocistos maduros do parasita são ingeridos por sapos adultos. Após uma reprodução assexuada no fígado do sapo, os parasitas infectam os eritrócitos, onde formam gamontes (DESSER et al., 1995). Estudo recenter não se encontrou nenhuma relação entre o número de leucócitos e intensidades de infecção por *Hepatozoon*. Dentre as possíveis explicações para tal especula-se que o *Hepatozoon* spp. possa ser benigno, evadir-se do sistema imune do hospedeiro, ou ainda interferir com os processos de mobilização dos leucócitos (SHUTLER et al., 2009).

Miosite associada com infecção por parasitas semelhantes a *Ichthyophonus* foi reportado em anfíbios de vida livre em Quebec no Canadá. O parasita foi diagnosticado em *R. clamitans*, *R. sylvatica*, *R. catesbiana*, *R. palustris* e *Pseudacris crucifer*. Os esporos do organismo invadiram a musculatura estriada e foram associados a diversos graus de granulomas e inflamação eosinofílica. A infecção foi fatal para 03 animais (SPEARE; BERGER, 2005). A sanguessuga de anfíbios *Placobdella picta* já foi relatada como transmissora de *Ichthyophonus* sp. A eutrofização causada pelo homem pode ocasionar o aparecimento e/ou aumento da severidade de surtos de *Ichthyophonus* sp. em anfíbios (RAFFEL; DILLARD; BARRY, 2006).

Diversos ectoparasitas também já foram encontrados. As moscas ou Dípteras são a única Ordem de insetos que parasita os anfíbios. As larvas das moscas podem parasitar ovos, girinos e animais adultos. Dentre as espécies descritas estão *Notochaeta bufonivora*, *Bufolucilla* spp. e *Batrachomyia mertensi*. Os carrapatos descritos são geralmente espécie-específicos (POYTON; WHITAKER, 2001). Smith et al. (2008) descreveram *Amblyomma rotundatum* em duas espécies de sapo no norte da Argentina. Há relatos de *Amblyomma* em *B. marinus* nas Américas Central e do Sul, causando congestão focal transitória e hemorragia (SPEARE; BERGER, 2005).

As sanguessugas geralmente são ectoparasitas, mas há relatos de uma espécie que invade os sacos linfáticos. Esta mesma espécie pode transmitir os organismos semelhantes a *Ichthyophonus* (RAFFEL et al., 2006).

Os artrópodes da Classe Branchiura são crustáceos que podem ser encontrados temporariamente presos à epiderme de girinos ou espécies que possuem adultos aquáticos. O ciclo de vida destes parasitas é direto. Pode haver lesões na pele causadas pela aderência e aos hábitos de alimentação dos animais. Algumas espécies se alimentam de sangue e outras de células epiteliais ou muco, o que pode resultar na perda da integridade da pele com consequente perda de homeostasia, infecções bacterianas ou fúngicas secundárias (POYTON; WHITAKER, 2001).

Os trombiculóides possuem apenas o estágio larval como parasitário, todas as outras fases são de vida livre. Os répteis e anfíbios são os hospedeiros naturais destas larvas e estas podem causar depleção sanguínea e vesículas eritematosas (WRIGHT, 2006).

Os anfíbios podem estar infectados por parasitas zoonóticos, que completam seu ciclo em seres humanos quando a carne dos anfíbios é ingerida crua ou não cozida adequadamente (DORNY et al., 2009). Tradicionalmente estas doenças são mais comuns na Ásia devido aos hábitos alimentares e à importância da aquicultura neste local. Alguns destes parasitas podem aparecer em outros países pela aquicultura, transporte destes animais para mercados internacionais, alterações de práticas culinárias ou aumento do turismo (KEISER; UTZINGER, 2005). A Esparganose ocorre ocasionalmente em humanos. É causada pela larva migrans de

Spirometra ou *Diphylobthrium*. Já foi reportada em diversos países, mas é mais comum no sudesteasiático. As migrações podem ocorrer nos olhos, tecidos subcutâneos, sistema nervoso central ou outros órgãos. A transmissão pode se dar pela água ou por carne de anfíbio ou serpentes (WIWANITKIT, 2005). *Angiostrongylus cantonensis* causa meningite eosinofílica em humanos após a ingestão de larvas infectantes presentes na água ou caramujos, hospedeiros paratênicos como os anfíbios ou em vegetais contaminados. Os ratos são os hospedeiros definitivos (ALICATA, 1991; LV et al., 2008).

2.3 MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica é um dos ecossistemas com a maior diversidade existente no mundo, e foi listado por Myers et al. (2000) como um *Hotspot*, ou seja, uma área de grande biodiversidade e de alta prioridade para conservação. Está entre os cinco *Hotspots* mais importantes do mundo. A Mata Atlântica possui altos índices de diversidade e endemismos, representando 2% de toda diversidade global de mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Originalmente estendia-se praticamente de forma contínua do Rio Grande do Sul até o Nordeste do país. Atualmente, restou apenas uma pequena porção da mata original, totalizando ao redor de 7%. Os maiores remanescentes estão localizados na Serra do Mar e Serra da Mantiqueira no Sudeste (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 1997 OU 1999?). Grande parte de suas matas foram destruídas para atividades de agricultura, pecuária e indústria e hoje a maior parte da população humana do país está concentrada nesta região (MITTERMEIER et al., 1999).

A Mata Atlântica possui diversas espécies endêmicas de anfíbios e segundo Eterovick e colaboradores, 2005, 31 espécies sofreram declínio nos últimos anos. Sabendo-se que as alterações do ambiente afetam populações de anfíbios no Brasil, e a grande destruição da Mata Atlântica, é lícito imaginar que este número seja maior. Na lista brasileira dos animais ameaçados de extinção, há 15 espécies

ameaçadas e uma extinta de anfíbios, todas pertencentes à Mata Atlântica (IBMA, 2003). Somando-se aos fatores citados anteriormente, segundo os trabalhos publicados com quitridiomicose no Brasil, todos os anfíbios são de animais da Mata Atlântica (CARNAVAL et al., 2005, 2006; TOLEDO et al., 2006b; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2006 FALTA REFERÊNCIA), o que pode representar mais uma ameaça para as espécies deste bioma.

A fauna de anfíbios anuros da Boracéia, como outros locais do neotrópico, é composta principalmente por hylideos, leptodactylideos e os anuros da família Bufonidae também são comuns, mas não apresentam uma grande diversidade. Ao contrário em vários locais do neotrópico não há dendrobatideos e apenas uma espécie de microhylideo. Há diversos gêneros, particularmente leptodactylideos que são endêmicos da Mata Atlântica e se reproduzem em bromélias, terra ou riachos de montanha (HEYER et al., 1990).

3 OBJETIVOS

Considerando a crise de extinção que globalmente afeta os anfíbios, o consequente impacto ambiental causado por esta perda de Biodiversidade, a expressiva carência de informações relativas à situação destes animais no Brasil e a necessidade de melhor compreender a importância das enfermidades neste processo em nosso país, em especial no Bioma Mata Atlântica, os objetivos do presente trabalho foram:

- Investigar, através de exames necroscópicos e histopatológicos as principais causas de morte e correspondentes alterações morfológicas acometendo anfíbios neotropicais de vida livre do Bioma Mata Atlântica;
- Pesquisar, por meio de ferramentas microbiológicas e moleculares, patógenos bacterianos, fúngicos e parasitários selecionados acometendo anfíbios neotropicais de vida livre no Bioma Mata Atlântica;
- Discutir os impactos que estes agentes e as respectivas enfermidades podem ter na sobrevivência de espécies de anuros neotropicais do bioma Mata Atlântica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

A Estação Biológica da Boracéia (Figuras 1 e 2), criada em 1954 (HEYER et al., 1990), é uma das áreas mais úmidas do país. É uma unidade de conservação, com cerca de 100 hectares, pertencente à Universidade de São Paulo e administrada pelo Museu de Zoologia. Possui aproximadamente 100 hectares (ha). Está localizada no estado de São Paulo, aproximadamente na latitude 23° 38' Sul e longitude 45°52' Leste, no município de Salesópolis (Figura 3). Está no domínio morfoclimático da Mata Atlântica, a uma altitude de aproximadamente 900m acima do nível do mar e a 12 km da costa do Atlântico. Há dois pequenos rios em seu interior: Rio Claro, que drena para o Rio Tietê, e o Rio Guaratuba, que drena para o oceano Atlântico. Geralmente o período de novembro a janeiro é quente e úmido e de maio a agosto é mais frio e seco. Ocasionalmente podem ocorrer temperaturas abaixo de zero, mas aparentemente causam poucos efeitos em longo prazo na herpetofauna da região, apesar da baixas temperaturas de 1979 poderem ter resultado em redução de população de diversas espécies. A precipitação anual é de 3058mm (HEYER et al., 1990) e há muita umidade na forma de neblina. A temperatura média nos últimos 20 anos foi de 21°C (média máxima 30,7°C e média mínima 7,3°C) (Rossi, 1999 apud Liou, 2008, p.9). A mata possui um baixo dossel, em média de 5 a 10 metros, mais alta nos vales. A mata contém uma camada de árvores e arbustos, mas esta distinção não é marcante. Há bromeliáceas em diversos locais como nas árvores, galhos, troncos e até no chão (HEYER et al., 1990).

4.2 COLHEITA DE ANIMAIS

Os animais foram procedentes da Estação Biológica da Boracéia localizada no Estado de São Paulo. Os pontos de colheita dos animais estão ilustrados na figura 3. A captura dos animais foi realizada através de procura ativa (Figura 4) sob a coordenação do Dr. Miguel Trefaut Urbano Rodrigues. Os animais foram colocados individualmente em sacos plásticos identificados, aerados e com um pouco de folhagem e água (Figura 5). Alguns animais foram colhidos em potes plásticos, como será descrito adiante. Os animais foram mantidos em locais tranquilos e com temperatura adequada para a minimização dos efeitos do estresse.

A licença para captura, colheita de material biológico e transporte do material biológico ao laboratório para o trabalho, foi aprovada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - Sisbio (Licença nº 14555-2), emitida em nome do Prof. Dr. Miguel Urbano Trefaut Rodrigues.

Os animais capturados na Estação Biológica da Boracéia foram transportados para o Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM), onde foi realizada a necropsia e colheita de material (Figura 6).

4.3 EUTANÁSIA

Os animais foram submetidos à eutanásia com doses acima de 100mg/kg de Tiopental® via IC e secção de medula, sendo que ambos os procedimentos foram conduzidos segundo indicação de Close et al. (1997), e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP (processo 1686/2009).

4.4 NECROPSIA

O exame necroscópico seguiu a técnica padrão adotada pelo LAPCOM para a Ordem Anura, Classe Anfíbia (MATUSHIMA, 2007), e consistiu do exame

ectoscópico atentando para o estado geral e a presença de ectoparasitas. Ainda com a carcaça fechada foi efetuado o exame dos orifícios naturais, observando-se o aspecto e coloração de mucosas, presença e natureza de conteúdos.

Após a análise das cavidades naturais, ocorreu a abertura da carcaça (Figuras 7 e 8). A marcha necroscópica prosseguiu com o exame dos órgãos "*in situ*". Todos os órgãos foram avaliados individualmente quanto à sua consistência, coloração, superfície externa, tamanho, forma, superfície de corte. Fragmentos dos órgãos e/ou tecidos abaixo apresentados foram colhidos, fixados em solução de formalina tamponada à 10% por 24-36 horas, sendo em seguida processados para inclusão em blocos de parafina. Nos animais de tamanho muito pequeno realizou-se apenas a abertura da cavidade celomática e fixação do animal inteiro para processamento histopatológico através da descalcificação da carcaça com ácido fórmico a 10% e realização de cortes transversais seriados da carcaça inteira.

Todos os animais incluídos no projeto que fizeram parte de coleções museológicas tiveram restrição quanto aos materiais colhidos, pois a preservação do espécime para a coleção museológica foi prioritária.

4.5 MICROBIOLOGIA

O exame microbiológico foi realizado apenas nos animais que foram processados no LAPCOM. No presente trabalho foi realizada a análise de amostras de sangue cardíaco ou, no caso de animais diminutos, fragmentos de fígado. O material, colhido próximo ao fogo no momento da necropsia, foi incluído em meio líquido para hemocultura (Oxoid –Sistema de Hemocultura Signal) (Figura 9). O processamento microbiológico foi realizado sob a supervisão da Dra. Maria Christina Cristóvão Ramos.

4.6 BIOLOGIA MOLECULAR

A ocorrência do patógeno *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) foi pesquisada através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), a partir de amostras de *swabs* de pele dos animais estudados. Esta etapa do trabalho esteve sob supervisão da Profa. Dra. Selene Dall' Acqua Coutinho, Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Paulista – UNIP, e parcela dos resultados foi originalmente apresentada na Dissertação de Mestrado da Médica Veterinária Julieta Burke. As amostras de *swabs* cutâneos foram colhidas diretamente das regiões ventral, laterais do corpo, interna das coxas e membros dos animais no momento da necropsia e armazenadas em álcool 95%.

4.7 PARASITOLOGIA

Durante a necrópsia, os parasitos encontrados foram colhidos, anotando-se sua respectiva localização. Após a colheita, os parasitas foram separados em recipientes e lavados em solução fisiológica a 0,9% para remoção dos detritos. Em seguida, estes foram submetidos à técnica de fixação recomendadas para cada grupo, segundo Gardner (informação verbal, 1997)¹.

Os nematódeos foram imersos em solução de ácido acético glacial por alguns minutos, em seguida, conservados em solução de álcool 70% glicerinado a 5%. Os pentastomídeos foram conservados diretamente em formol a 10%. A análise parasitológica foi supervisionada pela Dra. Kathleen Fernandes Grego, Pesquisadora Científica do Instituto Butantan.

¹ Informação fornecida por Gardner em São Paulo, 2001.

4.8 PROCESSAMENTO LABORATORIAL

4.8.1 Histopatologia

O processamento histopatológico foi realizado no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas. Do material fixado, após processado de acordo com as técnicas rotineiras de inclusão em parafina, obtiveram-se cortes de 5 μ m de espessura, que foram então corados pela técnica de hematoxilina-eosina.

4.8.2 Pesquisa de agentes bacterianos

O sangue ou fragmento de fígado colhidos foram incluídos em meio líquido para hemocultura (Oxoid –Sistema de Hemocultura Signal). O meio de cultura foi colocado em estufa a 37°C por uma hora. Após este período, acoplou-se o sistema indicador de crescimento e as amostras foram incubadas na mesma temperatura. As amostras foram examinadas com 24, 48 e 72 horas para verificar a presença de crescimento. O sistema indicador de crescimento do “Signal Blood Culture System” faz com que, nas amostras positivas, haja acúmulo do meio de cultura e as amostras para semeadura possam ser retiradas deste local. As amostras positivas foram semeadas em meio BHI e incubadas a 37°C por 72 horas e as leituras realizadas a 24, 48 e 72 horas. As colônias foram então examinadas no microscópico no aumento 1000x em óleo de imersão para identificação do tipo de colônia tendo então sido realizados exames bioquímicos de glicose e oxidação.

4.8.3 Pesquisa de BD

A extração do rDNA fúngico ocorreu através do *Genomic DNA Mini kit* (Invitrogen) de acordo com as normas do fabricante.

A identificação de *B. dendrobatidis* foi realizada por PCR conforme método descrito por Annis et al. (2004), com limite de detecção ao redor de 10 zoósporos do fungo, utilizando-se iniciadores com seqüências específicas (Quadro 1). Cada amostra foi testada em reações de 25µL contendo 1µL de DNA extraído, 12,5µl de *Taq Green máster mix*, 1,0µl de *primer upstream*, 1,0µl de *primer downstream* e 9,5µl de água livre de nucleases. As reações foram submetidas ao ciclo de amplificação em termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*, sendo inicialmente aquecidas a 93°C por 10 minutos e em seguida sofreram 30 ciclos: desnaturação a 93°C por 45 segundos, 45 segundos a 60°C para anelamento, extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final de 10 minutos.

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%), coradas em brometo de etídio, visualizadas em transiluminador UV e fotografadas pelo sistema *Gel Logic 200, Kodak*.

Utilizou-se como padrão positivo DNA de *B. dendrobatidis*, cedido pelo Dr. Allan Pessier, do *Amphibian Disease Laboratory* da *San Diego Zoological Society*, California, EUA.

Iniciador	Seqüência	Tamanho do amplificado (pb)
Bd1a	5' CAGTGTGCCATATGTCACG 3'	300
Bd2a	5' CATGGTTCATATCTGTCCAG 3'	

Fonte: Annis et. al. (2004).

Quadro 1- Seqüência de iniciadores para identificação de *B. dendrobatidis*

4.8.4 Parasitologia

Os metazoários e protozoários encontrados em cortes histopatológicos corados pela técnica de hematoxilina e eosina foram identificados através da observação de estruturas específicas (GARDNER, 1998, 1999).

Os trematódeos e cestódeos conservados em formol a 10% foram corados pelo carmim clorídrico alcoólico, para melhor observação das estruturas utilizadas para a identificação dos gêneros e espécies. Após corados, os parasitos foram mensurados e as principais estruturas morfológicamente estudadas, utilizando-se para isso microscópio equipado com ocular micrométrica e acompanhamento de chaves de identificação. Os pentastomídeos, conservados em formol a 10%, foram observados ao estereoscópio óptico e as espécies identificadas segundo os principais caracteres de machos e fêmeas (YAMAGUTI, 1958, 1959)

Os nematódeos, conservados em álcool 70% glicerinado, foram visualizados imergidos em glicerina com auxílio de microscópio e/ou estereoscópio ópticos modelo Olympus SZX12 (YAMAGUTI, 1961).

4.9 CONSOLIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados anátomo-patológicos obtidos foram consolidados segundo os diagnósticos principais, associados aos dados microbiológicos, moleculares e parasitários.

Figura 1 – Estação Biológica da Boracéia

Figura 2 – Estação Biológica da Boracéia

Mauro Teixeira Junior, 2011

Figura 3 - Mapa de localização da Estação Ecológica da Boracéia e pontos de colheita de animais em vermelho

Figura 4 - Procura ativa de animais. Foto: Marco Aurélio de Sena.

Figura 5 – Animal coletado em saco plástico. Foto: Angélica Sanchez.

Figura 6 – Espécime coletado. Foto: Angélica Sanchez.

Figura 7 – Necrópsia de animal. Foto: Catia D. De Paula

Figura 8 - Necropsia de animal. Foto: Angélica Sanchez.

Figura 9 – Preparação para colheita de exame microbiológico. Foto: Catia D. De Paula

5 RESULTADOS

5.1 ANIMAIS

Colheu-se um total de 120 animais de 33 espécies diferentes, sendo que duas destas foram identificadas somente até o gênero. As 33 espécies são pertencentes a sete famílias diferentes: Brachycephalidae (4), Bufonidae (3), Craugastoridae (1), Hylidae (19), Hylodidae (2), Leiuperidae (1) e Leptodactylidae (3). As famílias, espécies e número e porcentagem de espécimes coletados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos animais amostrados em função da Família, espécie, número de espécimes e frequência. Estação Ecológica da Boracéia, SP, 2009-2010. N = 120

(Continua)

Família	Espécie	Número de espécimes	Frequência (%)*
Brachycephalidae	<i>Ischnocnema juipoca</i>	4	3,3
	<i>Ischnocnema parva</i>	3	2,5
	<i>Ischnocnema randorum</i>	1	0,8
	<i>Ischnonecnema guentheri</i>	3	2,5
Bufonidae	<i>Rhinella</i> sp.	1	0,8
	<i>Rhinella icterica</i>	1	0,8
	<i>Rhinella ornata</i>	3	2,5
Craugastoridae	<i>Hadaddus binotatus</i>	2	1,7
Hylidae	<i>Aplastodiscus arildae</i>	3	2,5
	<i>Aplatodiscus albosignatus</i>	1	0,8
	<i>Aplatodiscus leucopygius</i>	1	0,8
	<i>Bokermannohyla astartea</i>	6	5,0
	<i>Bokermannohyla circumdata</i>	2	1,7
	<i>Bokermanoyla hylax</i>	2	1,7

(Conclusão)			
Família	Espécie	Número de espécimes	Frequência (%)*
	<i>Derndropsophus microps</i>	6	5,0
	<i>Dendropsophus minutus</i>	6	5,0
	<i>Hypsiboas albomarginatus</i>	1	0,8
	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	3	2,5
	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	9	7,5
	<i>Hypsiboas faber</i>	5	4,2
	<i>Hypsiboas pardalis</i>	3	2,5
	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	9	7,5
	<i>Scinax alter</i>	6	5,0
	<i>Scinax brienii</i>	4	3,3
	<i>Scinax crospedophilus</i>	5	4,2
	<i>Scinax hayii</i>	8	6,7
	<i>Scinax sp.</i>	3	2,5
Hylodidae	<i>Hylodes asper</i>	7	5,8
	<i>Hylodes phyllodes</i>	3	2,5
Leiuperidae	<i>Physalaemus cuvieri</i>	2	1,7
Leptodactylidae	<i>Adenomera marmorata</i>	2	1,7
	<i>Leptodactylus latrans</i>	4	3,3
	<i>Paratelmatobius cardosoi</i>	1	0,8

* A somatória pode ser maior que 100% em função de arredondamento das porcentagens relativas.

5.2 PESQUISA DE AGENTES BACTERIANOS

Colheram-se amostras para pesquisa de agentes bacterianos de 53,3% (64/120) dos animais amostrados. Houve crescimento bacteriano em 56,2% (36/64) das amostras, porém, devido a considerações que serão discutidas a frente, estes resultados foram tidos como decorrentes de contaminação bacteriana. Em 43,8% (28/64) das amostras não houve qualquer crescimento bacteriano. Há, no apêndice A, uma tabela mais detalhada dos resultados da microbiologia.

5.3 EXAME PARASITOLÓGICO

Encontrou-se, no exame necroscópico, endoparasitas em 45,8% (55/120) dos espécimes examinados. O total de metazoários isolados foi de 68 exemplares (Figuras 11 a 16). Destes, 19% (13/68) não puderam ser identificados. Dos metazoários identificados, 90,2% (46/51) eram nematódeos, enquanto 9,8 (5/51) eram cestódeos. Dentre os nematódeos, os metazoários identificados em nível de gênero foram: *Aplectana* sp. (10/51), *Cosmocerca* sp. (4/51), *Oswaldosruzia* sp. (2/51), *Oxyascaris* sp. (26 /51), *Pteroxyascaris* sp. (1/51), *Rhabdias* sp. (1/51), *Strongyloides* sp. (1/51). Dentre os cestódeos Pterocercoide foi observado em (5/51). A identificação dos metazoários reportados baseou-se nos dados morfológicos empregados para a classificação, conforme apresentado no anexo C.

Foi encontrado ectoparasita em apenas 01 animal (0,8%; 1/120), uma *Rhinella ornata* que apresentou sanguessugas na região cervical e na pata posterior. A tabela 2 distribui os parasitas encontrados em função da Classe e gênero dos parasitas, localização do parasitismo, número absoluto e frequência de anuros infectados por parasita.

Há, no apêndice A, uma tabela mais detalhada dos resultados parasitológicos.

Tabela 2 - Distribuição dos metazoários observados em função da Classe e gênero dos parasitas, localização do parasitismo, número absoluto e frequência de anuros infectados. Estação Ecológica da Boracéia, SP, 2009-2010 N = 120

Classe	Gênero	Localização anatômica	Número *	Frequência %
Nemátod a	<i>Aplectana</i> sp.	Intestino delgado	8	5,8
		Intestino grosso	2	1,7
	<i>Cosmocerca</i> sp.	Intestino delgado	1	0,8
		Intestino grosso	3	2,5
	<i>Oswaldocruzia</i> sp.	Intestino delgado	2	1,7
	<i>Oxyascaris</i> sp.	Intestino delgado	24	20
		Intestino grosso	1	0,8
		Cavidade celomática	1	0,8
	<i>Pteroxyascaris</i> sp.	Intestino delgado	2	1,7
		intestino grosso	2	1,7
	<i>Rhabdias</i> sp.	Pulmão	1	0,8
	<i>Strongyloides</i> sp.	Coração	1	0,8
Cestóda	Plerocercóide	Intestino delgado	5	4,2

5.4 PESQUISA DE Bd

Foram analisadas amostras de *swabs* cutâneos de 115 animais. Do total de animais analisados, 19,1% (22/115) foram positivos para Bd. A figura 10 exemplifica resultados positivos em gel de agarose de 12 amostras. A tabela 3 distribui os resultados da detecção molecular de Bd em função das espécies analisadas e das frequências de ocorrências.

Com relação às áreas dentro da Boracéia, dentre os espécimes com a origem exata determinada (75), encontrou-se 01 *Hylodes phyllodes* positivo em riacho próximo à represa de Guaratuba (ponto 2), uma *Scinax alter* na lagoa do aterro (ponto 5), um *Dendrophopos minutus* na lagoa da estrada (ponto 7) e um *D. minutus* e uma *Bokermannohyla circumdata* na Pedreira (ponto 08). Os pontos estão descritos na figura 10. Estes dados mostram que há animais positivos para Bd em áreas próximo ao Rio Claro e também em riacho próximo ao Rio Guaratuba que são os principais rios que cortam a Boracéia.

Há, no apêndice A, uma tabela mais detalhada dos resultados do exame molecular para Bd.

Fonte: Burke (2011)².

Figura 10 - Fotografia de resultados positivos para Bd. Números 1 e 16: padrão de peso molecular (100pb); número 2 padrão positivo para B. dendrobatidis; números 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14 e 15: amostras testadas e positivas para B. dendrobatidis; número 13 amostra testada e negativa para B. dendrobatidis. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)²

² Imagem originalmente publicada na Dissertação de Mestrado da MV Julieta Burke, março de 2011.

Tabela 3 - Distribuição dos resultados positivos para Bd em função da Família e espécie de anfíbio, número absoluto de animais examinados por espécie, número de animais infectados e frequência de positividade. Estação Ecológica da Boracéia, SP, 2009-2010. N = 115

Família	Espécie	Número de ani	Número de animais	% Positivo
Brachycephalidae	<i>Ischnocnema juipoca</i>	4	0	0,0
	<i>Ischnocnema parva</i>	3	2	1,7
	<i>Ischnocnema randorum</i>	1	1	0,9
	<i>Ischnonecnema guentheri</i>	3	0	0,0
Bufonidae	<i>Rhinella ornata</i>	3	0	0,0
Craugastoridae	<i>Hadaddus binotatus</i>	2	1	0,9
Hylidae	<i>Aplastodiscus arildae</i>	3	1	0,9
	<i>Aplatodiscus albosignatus</i>	1	0	0,0
	<i>Aplatodiscus leucopygius</i>	1	1	0,9
	<i>Bokermannohyla astartea</i>	6	2	1,7
	<i>Bokermannohyla circumdata</i>	2	1	0,9
	<i>Bokermannohyla hylax</i>	1	0	0,0
	<i>Dendropsophus microps</i>	6	1	0,9
	<i>Dendropsophus minutus</i>	6	1	0,9
	<i>Hypsiboas albomarginatus</i>	1	1	0,9
	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	3	0	0,0
	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	9	1	0,9
	<i>Hypsiboas faber</i>	3	2	1,7
	<i>Hypsiboas pardalis</i>	3	1	0,9
	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	9	0	0,0
	<i>Scinax alter</i>	6	2	1,7
	<i>Scinax brienii</i>	4	0	0,0
	<i>Scinax crospedophilus</i>	5	0	0,0
	<i>Scinax hayii</i>	8	0	0,0
	<i>Scinax</i> sp.	3	0	0,0
	<i>Hylodes asper</i>	7	2	1,7
	<i>Hylodes phyllodes</i>	3	1	0,9
Leiuperidae	<i>Physalaemus cuvieri</i>	2	0	0,0
Leptodactylidae	<i>Adenomera marmorata</i>	2	0	0,0
	<i>Leptodactylus latrans</i>	4	0	0,0
	<i>Paratelmatobius cardosoi</i>	1	0	0,0

5.5 EXAMES ANÁTOMO-PATOLÓGICOS

O exame necroscópico da grande maioria dos animais estudados não exibiu alterações relevantes. Os principais achados observados foram 01 ectoparasita cutâneo (sanguessuga) não identificado em um exemplar de *Rhinella ornata* (figura 18), metazoários sem lesões associadas, ausência parcial de membro anterior esquerdo em 01 exemplar *Ischnocnema guentheri* (figura 17) e anisocoria em 01 espécime de *Bokermannohyla astartea*.

Dos 120 animais amostrados, foi realizada análise histopatológica de 114 espécimes (apêndice B). De forma semelhante, a grande maioria dos animais analisados não exibiu alterações histopatológicas relevantes, sendo que em todos os casos, os achados microscópicos reportados foram classificados como discretos a moderados (figuras 19 a 34). O gráfico 1 distribui os sistemas orgânicos em função das frequências de acometimentos observados histologicamente. A tabela 4 distribui as frequências dos achados histopatológicos mais relevantes em função do número total de animais.

Com relação às áreas dentro da Boracéia, dentre os espécimes com a origem exata determinada (75), encontrou-se um *Hylodes phyllodes* positivo em riacho próximo à represa de Guaratuba (ponto 2), uma *Scinax alter* na lagoa do aterro (ponto 5), um *Dendrophopos minutus* na lagoa da estrada (ponto 7) e um *D. minutus* e uma *Bokermannohyla circumdata* na Pedreira (ponto 08). Os pontos estão descritos na figura 3. Estes dados mostram que há animais positivos para Bd em áreas próximo ao Rio Claro, assim como em riacho próximo ao Rio Guaratuba, leitos que são os principais rios que cortam a Boracéia.

A identificação dos metazoários reportados em cortes histológicos baseou-se nos dados morfológicos empregados para a classificação, conforme apresentado para protozoários por Gardiner, Fayer e Dubey (1988) e para metazoários Gardiner e Poynton (1999).

Gráfico 1 - Porcentagem dos sistemas acometidos por alteração histopatológicas nos anfíbios anuros coletados na estação Ecológica da Boracéia. N = 114

Tabela 4- Frequência das principais alterações encontradas nos exames histopatológicos em função do número de espécimes analisados de anfíbios anuros da Estação Biológica da Boracéia (Continua)

Sistemas	Processo	Número de espécimes	Frequência (%)
Pele			
	Dermatite	19	16,7
	Hiperqueratose epidermal	15	13,2
	Hiperplasia epidermal	5	4,4
	Infecção por Batrachochytrium dendrobatidis	3	2,6
	Adenite de glândula serosa	1	0,9
Trato digestório			
	Hepatite	13	11,4
	Hiperplasia hepática de melanomacrófagos	13	11,4
	Parasitismo em vesícula biliar (Myxozoários)	12	10,5
	Parasitismo intestinal (Nematóide em intestino grosso)	11	9,6
	Hiperplasia linfóide esplênica	9	7,9
	Parasitismo intestinal (Protozoário ciliado em intestino grosso)	7	6,1
	Parasitismo Intestinal (Protozoário ciliado em intestino delgado)	5	4,4

(Conclusão)

Sistemas	Processo	Número de espécimes	Frequência (%)
	Acúmulo de glicogênio hepático	5	4,4
	Gastrite	4	3,5
	Parasitismo intestinal (Nematóide em intestino delgado)	4	3,5
	Parasitismo intestinal (Nematóide)	2	1,7
	Parasitismo intestinal (Protozoários ciliados)	2	1,7
	Parasitismo estomacal	1	0,9
	Nematóide em parede estomacal	1	0,9
	Parasitismo intestinal (Opanilídios)	1	0,9
	Parasitismo intestinal (Larvas de nematóide em intestino delgado)	1	0,9
	Parasitismo intestinal (Opanilídio em intestino delgado)	1	0,9
	Enterite parasitária	1	0,9
	Parasitismo intestinal (Opanilídio em intestino grosso)	1	0,9
	Enterite parasitária (Strongyloides sp. na mucosa de intestino grosso)	1	0,9
	Parasitismo intestinal (Ovos de parasitas em intestino grosso)	1	0,9
	Congestão hepática	3	2,6
	Hematopoiese extra medular hepática	1	0,9
	Hematopoiese extra medular esplênica	5	4,4
Cardiovascular			
	Epicardite	4	3,5
	Perilinfagite	1	0,9
Respiratório			
	Congestão pulmonar	3	2,6
	Parasitismo pulmonar	3	2,6
	Pneumonia	2	1,7
Urinário			
	Nefrite	8	7
	Hematopoiese extra medular renal	5	4,4
	Congestão renal	3	2,6
	Cistite	3	2,6
	Parasitismo renal (Myxozoários)	2	1,7
	Dilatação de túbulos	1	0,9
Outros*			
	Atrofia de gordura	10	8,8
	Celomite	4	3,5
	Parasitismo (Acanthocephala sp). em cavidade celomática	1	0,9
	Parasitismo (Acanthocephala sp.) em musculatura estriada	1	0,9

Figura 11 - *Oxyascaris* sp. Note os lábios reduzidos sem cápsula bucal (seta branca) e esôfago com ventrículo terminado em bulba glandular (seta preta). Foto: Kathleen Grego

Figura 12 - *Oxyascaris* sp. Perceba região anal com pequena espícula (seta). Foto: Kathleen Grego

Figura 13 - *Aplectana* sp. Visualize região anal com espícula e presença de diversos ovos no interior da fêmea (seta). Foto: Kathleen Grego

Figura 14 - *Oswaldocruzia* sp. macho. Note a cabeça com dilatação cuticular vesiculosa. Foto: Kathleen Grego

Figura 15 - *Cosmocerca* sp. Perceba a presença de lábios pequenos e um esôfago com curto. Foto: Kathleen Grego

Figura 16 - *Cosmocerca* sp. macho. Observe a pequena espícula em região da cauda. Foto: Kathleen Grego

Figura 17 - *Ischnocmena guentheri* com ausência parcial de membro anterior esquerdo

Figura 18 - *Rhinella ornata* com sanguessuga em região da cabeça

Figura 19 - Fotomicrografia de pele de *Bokermannohyla hylax*. Observe a presença de infiltrado linfocitário desorganizando a epiderme (seta). Dermatite linfocitária multifocal. Coloração HE, 200X

Figura 20 - Fotomicrografia de pele e saco linfático associado (cabeça de seta) de *Hypsiboas bischoffi*. Visualize a presença de infiltrado granulocítico adjacente à parede do saco linfático (seta). Perilifangite granulocítica. Coloração HE, 100X

Figura 21 - Fotomicrografia de fígado e vesícula biliar de *Scinax Alter*, note a presença de múltiplas estruturas compatíveis com Myxozoário (setas). Coloração HE, 40X.

Figura 22- Fotomicrografia de rim do animal *Bokermannohyla hylax*. Note a ocorrência de myxozoários no interior de túbulos. Coloração HE, 100x.

Figura 23 - Fotomicrografia de bexiga de *Hypsiboas pardalis*. Perceba a presença de *Acanthocephala* associado à exsudação inflamatória. Cistite parasitária. Coloração HE, 100X

Figura 24 - Fotomicrografia de intestino delgado do animal *Rhinella* sp. Visualize a presença de nematóide com estruturas compatíveis com *Oxyurus* sp. (seta preta), protozoários ciliados (cabeça de seta preta) e opanilídios (cabeça de seta vermelha). Perceba ausência de resposta inflamatória. Coloração HE, 100X

Figura 25- Fotomicrografia de rim de *Hypsiboas polytaenius*. Observe a presença de granuloma parasitário subcapsular contendo trematóide (seta). Nefrite granulomatosa subcapsular parasitária. Coloração HE, 100X

Figura 26 - Fotomicrografia de intestino grosso de *Hypsiboas polytaenius*. Note a presença de parasita com estruturas compatíveis com *Strongyloides* sp. embebidos na mucosa intestinal (seta). Coloração HE, 200X

Figura 27 - Fotomicrografia de fígado de *L. latrans*. Note a ocorrência de granuloma com estruturas compatíveis com protozoário (seta) e melanomacrófagos (cabeça de seta). Hepatite granulomatosa parasitária. Coloração HE, 400X

Figura 28- Fotomicrografia de pulmão de *Bokermannohyla hylax*. Observe cortes transversais de nematóides com estruturas compatíveis com *Rhabdias* sp. Perceba ausência de resposta inflamatória. Coloração HE

Figura 29- Fotomicrografia do tecido gorduroso de *Hypsiboas faber*, visualize a alta concentração de tecido gorduroso depletado. Atrofia gordurosa. HE 40X

Figura 30 - Fotomicrografia de rim de *L. latrans*. Observe aglomerado de células mononucleares no parênquima renal. Nefrite intersticial mononuclear. Coloração HE, 200X

Figura 31 - Fotomicrografia de fígado de *Hylodes asper*. Note grande quantidade de melanomacrófagos (seta) associado a foco de infiltrado inflamatório. Hiperplasia de melanomacrófagos e hepatite mononuclear. Coloração HE, 100X

Figura 32 - Fotomicrografia de baço de *Hypsiboas bischoffi*. Visualize a presença de um ninho de células mielóides blásticas (seta). Hematopoiese extra medular. Coloração HE, 400X

Figura 33 - Foto de pele de *Hypsiboas pardalis*. Observe a presença de estruturas compatíveis com *Batrachochytrium dendrobatidis* (seta vermelha) associada a hiperqueratose (seta preta) e hiperplasia de epitélio (cabeça de seta). Coloração HE, 400X

Figura 34- Zoosporângio de *Batrachochytrium dendrobatidis* com zoósporos em seu interior. *Physalaemus cuvieri* procedente do Zoo de São Paulo. Coloração HE, 1000X

6 DISCUSSÃO

6.1 ANIMAIS

No presente trabalho, os anfíbios anuros mais colhidos na Boracéia foram da família Hylidae. Este dado corrobora os dados obtidos por Hayer et al. (1990), que citam as famílias Hylidae, Leptodactylidae e Bufonidae como as mais comuns naquela região. Importante mencionar que exemplares de espécies das duas últimas famílias também foram coletados.

O método de procura ativa se mostrou eficiente para o propósito deste trabalho, porém é importante salientar que não houve complementação com outros métodos de colheita, como as armadilhas de queda, impedindo assim que se faça inferência mais detalhada sobre os processos mórbidos verificados para as populações de anfíbios da Boracéia como todo.

6.2 AGENTES BACTERIANOS

No presente trabalho, em 53,3% (64/120) dos casos houve crescimento bacteriano a partir do cultivo de amostras do sangue cardíaco ou fragmentos de fígado. Porém, após análise cuidadosa destes resultados microbiológicos, suspeitamos que se tratava de contaminação decorrente dos métodos de colheita empregados. Desta forma, a partir desta suposição, uma série de medidas foi tomada com o objetivo de minimizar os riscos de contaminação. Neste sentido, reduziu-se o número de animais coletados em cada expedição de campo com vistas a diminuir o período em que o animal era mantido no saco plástico antes de ser manipulado. As outras medidas adotadas foram o uso de recipientes e papel toalha autoclavados, assim como limpeza do animal com água mineral autoclavada. Optou-se também por lavar os animais com água estéril após a eutanásia e então limpar a pele da região de corte com álcool iodado. Ainda, em virtude da dificuldade de colher de forma

asséptica os fragmentos de fígado, optou-se por processar microbiologicamente somente aqueles animais de maior porte, dos quais era possível obter amostras viáveis de sangue cardíaco. Após a padronização dos procedimentos acima descritos não houve mais crescimento bacteriano nas culturas de sangue cardíaco. Ainda, tanto nos exames necroscópicos, como nas avaliações histopatológicas efetivadas, não foram observadas alterações relevantes que sustentassem o diagnóstico de infecção bacteriana. Tais fatos acima mencionados corroboram a nossa suposição de que os primeiros resultados microbiológicos obtidos eram decorrentes de contaminação bacteriana, e não de efetiva bacteremia.

Não é do nosso conhecimento a existência de trabalhos descrevendo resultados de hemocultura em anfíbios aparentemente saudáveis de vida livre. Por outro lado, grande parte dos trabalhos publicados envolvendo a participação de agentes bacterianos é de investigações envolvendo animais doentes mantidos em cativeiro. Segundo Pessier (2007), as doenças bacterianas são a principal causa de morbidade e mortalidade em anfíbios cativos, sendo que as bactérias relacionadas predominantemente são Gram negativas, apesar de já terem sido descritas infecções causadas por bactérias Gram positivas (WRIGHT, 2006).

Apesar de não ser possível inferir com segurança para toda a população de anfíbios anuros da Boracéia, os resultados negativos das hemoculturas, associados à ausência de lesões macro e microscópicas compatíveis com infecções bacterianas, nos permitem sugerir que no presente momento patógenos bacterianos não representam uma causa de morbidade/mortalidade relevantes na população de anfíbios estudada. Por outro lado, considerando os crescentes impactos antropogênicos aos quais a Mata Atlântica está expostas, cremos ser importante monitorar periodicamente a ocorrência e/ou surgimento de patógenos bacterianos nesta população de anfíbios, haja vista o delicado equilíbrio existente.

6.3 PARASITAS

No presente trabalho, a prevalência de metazoários observada nos anfíbios anuros estudados foi de 48,5%. Dentre os Metazoários foram descritos *Aplectana* sp., *Cosmocerca* sp., *Oswaldocruzia* sp., *Pteoxyascaris* sp., *Rhabdias* sp., *Strongyloides* sp. e *Plerocercoides*. Sanguessuga, sem definição de gênero, foi o único ectoparasita reportado. O exame histopatológico revelou *Acanthocephala* sp., Ascarídeos, Trematódas, Myxozoários, protozoários ciliados, Opanilídeos, *Oxyurus* sp., *Rhabdias* sp. e *Strongyloides* sp.

Os relatos de parasitas de anfíbios no Brasil são geralmente restritos a apenas uma espécie de anuro para uma determinada região, ou a partir de espécimes de museus (Anexo B). Não há descrição, no Brasil, de parasitas de anfíbios em cortes histológicos. Poucos são os trabalhos publicados que estudaram parasitas em diversas espécies de anuros provenientes de um mesmo local (GOLDENBERG, 2010). Com base em dados de literatura, não é possível saber o significado da prevalência de 45,8% encontrada em nosso trabalho. A imensa maioria dos gêneros de parasitas aqui encontrados já havia sido descrita na literatura, assim como o órgão em que estavam presentes. Por outro lado, o *Oxyascaris* sp., que foi o gênero mais prevalente em nossa pesquisa, foi descrito recentemente acometendo intestino grosso de *Rhinella icterica*, com uma prevalência de 3% (LUQUE et al., 2005), apesar de haver sido descrito em diversas outras espécies (VICENTE et al., 1991).

Tanto os exames necroscópicos quanto os histopatológicos não mostraram alterações relevantes causadas pelos parasitas reportados. Macroscopicamente não houve qualquer alteração digna de nota. No exame histopatológico observou-se a presença de discretos granulomas parasitários em estômago, fígado, rim, bexiga e cavidade celomática. Em todos os casos, exceto naqueles envolvendo granulomas parasitários, não havia outras alterações associadas, ou mesmo um comprometimento significativo do órgão, que pudessem sugerir alguma perda de função do mesmo. Além dos metazoários, outros parasitas, como os opanilídios e os protozoários flagelados, também foram observados. Segundo a literatura disponível, tais parasitas são achados frequentes nos intestinos de anfíbios, geralmente sem

causarem danos relevantes (POYNTON; WHITAKER, 2001), informação que corrobora os achados do nosso trabalho.

Com relação aos myxozoários, há relatos da existência de espécies patogênicas causando lesões em rim, fígado, gônadas e pele (DUNCAN; GARNER; BARTHOLOMEU, 2004; MUTSCHMANN, 2004; SITJÀ-BOBADILLA, 2009; SZCZEPANIA; TOMCZUK; STUDZINSK, 2011). No presente trabalho estes parasitas foram encontrados em vesícula biliar e rim, porém, sem causar reação nos órgãos acometidos. Considerando a existência de informações publicadas sobre processos patológicos em anfíbios envolvendo myxozoários, julgamos oportunas investigações sanitárias mais detalhadas sobre o potencial patogênico dos parasitas aqui encontrados.

A ausência de lesões causadas pelos parasitas nos animais examinados indica uma aparente apatogenicidade destes nas condições específicas do nosso trabalho. É possível supor que em vida livre, a chance de um animal com severa carga parasitária ser predado seja maior devido à debilidade que esta infecção pode causar no animal (TEMPLE, 1987). Neste caso, é lícito supor que as chances destes animais serem colhidos nas condições das expedições aqui realizadas sejam pequenas, pois, provavelmente eles já teriam sido eliminados da população pelos predadores naturais.

Semelhantemente ao que foi dito para as infecções bacterianas, cremos que seja necessário o estabelecimento de trabalhos de monitoramento a longo prazo para afirmar se os parasitas encontrados no presente trabalho podem ou não estar causando algum dano às populações de anfíbios anuros da Boracéia. Por outro lado, é lícito supor que o processo de co-evolução, entre outros, dos parasitas com os seus respectivos hospedeiros fez com que aqueles convivam sem causar severos danos, nas condições ambientais para os quais foram selecionados. Neste contexto, é possível prever que alterações ambientais severas possam, excepcionalmente, causar distorção nesta relação parasita X hospedeiro, e suscitar a ocorrência de quadros mórbidos decorrentes de infecções descontroladas (HUDSON et al., 2002).

Os resultados aqui apresentados, cotejados com aqueles existentes na literatura, corroboram a idéia de que o significado de parasitemias é dependente

também das condições em que os animais se encontram (HUDSON et al., 2002). Neste sentido, a importância de infecções parasitárias em animais de vida livre é, presumivelmente, muito diferente daquela vista para animais mantidos em cativeiro. É sabido que muitos parasitas podem causar danos severos aos animais em cativeiro, principalmente aqueles que possuem ciclo direto, pois tais condições potencializam as re-infecções, em especial quando não há medidas de manejo sanitário necessárias para a eliminação dos mesmos. Ainda, em cativeiro, devido à impossibilidade de mimetizar completamente as condições naturais, é cabível inferir que as ocorrências de situações de estresse possibilitem quadros de imunossupressão, fazendo com que parasitas que não estavam causando dano algum possam se tornar, subitamente, patogênicos. Tal cenário já foi sugerido para o “Kahinsy Spray Toad”, espécie que se encontra provavelmente extinta na natureza e teve mortalidades em cativeiro causadas por um nematóide rabditiforme (LEE et al., 2006)

6.4 BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS (Bd)

No presente trabalho encontrou-se uma prevalência de infecção pelo Bd de 19,1% (22/115) nos animais colhidos na Estação Biológica da Boracéia. Com relação às áreas dentro da Boracéia, dentre os espécimes com a origem exata determinada (75), encontrou-se um *Hylodes phyllodes* positivo em riacho próximo à represa de Guaratuba (ponto 2), uma *Scinax alter* na lagoa do aterro (ponto 5), um *Dendrophopos minutus* na lagoa da estrada (ponto 7) e um *D. minutus* e uma *Bokermannohyla circumdata* na Pedreira (ponto 08). Os pontos estão descritos na figura 3. Estes dados mostram que há animais positivos para Bd em áreas próximo ao Rio Claro, assim como em riacho próximo ao Rio Guaratuba, leitos que são os principais rios que cortam a Boracéia.

Já foram encontradas diferentes prevalências de Bd em animais vivos em diversas regiões do mundo como, por exemplo, 17,8% (302/1698) em Quebec no Canadá (OUELLET et al., 2003), 2,4% (9/382) em *Eleutherodactylus coqui* no Havaí

(BEARD; O'NEILL, 2005) e 20% (16/64) em Tobago (ALEMU et al., 2009). Em trabalhos com animais coletados em museus ou fixados em formol e não depositados em coleções, encontrou-se uma prevalência de 13,1% (383/2931) em animais colhidos em diversos países do mundo e tombados em museus canadenses (OUELLET et al., 2003), 5,6% na Colômbia (3/53), 5,9% (12/202) na Costa Rica (PUSCHENDORF; BALAÑOS, 2006) e 21% (4/19) em Honduras. No Brasil, a prevalência de animais colhidos em museus foi de 5,76% (6/96) (CARNAVAL et al., 2006).

Como pode ser depreendido dos dados acima mencionados, há expressiva variação nas diversas prevalências reportadas de Bd. Tais diferenças se devem, acreditamos, a múltiplos fatores, tais como características das regiões amostradas, espécies presentes, métodos de diagnóstico utilizados, e mesmo se a investigação envolveu animais assintomáticos, sintomáticos ou mortos. Desta forma, julgamos prematuro e arriscado a elaboração de juízo sobre a prevalência observada em nosso trabalho e firmemente recomendamos a realização de estudos complementares e comparativos em regiões assemelhadas, com vistas a compor um cenário mais fidedigno da situação relativa à ocorrência do Bd na Boraceia.

O Bd já foi encontrado acometendo diversas espécies de anfíbios em vários locais da Mata Atlântica (CARNAVAL et al., 2006; TOLEDO et al. 2006b). Dentre as espécies que se mostraram infectadas no presente trabalho, o Bd já havia sido descrito em girinos de *H. phyllodes* de São Luiz do Paraitinga (SP) e *B. circumdata* de Petrópolis (RJ) (TOLEDO et al., 2006b). Desta forma, no nosso conhecimento, o presente trabalho significa a primeira descrição de infecção pelo Bd para as espécies *Aplastodiscus leucopygeus*, *Dendropsophus minutus*, *Ischnocnema randorum*, *I. parva*, *I. guentheri*, *Hypsiboas bischoffi*, *H. faber*, *H. polytaenius* e *Hylodes asper*.

Por outro lado, no nosso trabalho não encontramos animais mortos com alterações morfológicas compatíveis ou identificação molecular de Bd, assim como espécimes exibindo sinais clínicos de quitridiomicose. Isto sugere que no período e nas áreas pesquisados o fungo não estava causando enfermidade clinicamente aparente e/ou morte dos animais. Dados existentes na literatura citam declínio de anfíbios na Boracéia (HEYER et al., 1988; BERTOLUCCI; HEYER, 1995), apesar de

também haver relatos de recuperação de algumas espécies, como *Adenomera marmorata*, *Eleutherodactylus guentheri* e *Scinax perpusilus*, além da redescoberta de *Hylodes asper* (LANGE, 2004). Alguns destes declínios foram relacionados a baixas temperaturas (HEYER et al., 1988). Infelizmente, a análise dos dados disponíveis sobre os processos de declínios de anfíbios na Boracéia não permitem correlacionar estes fenômenos populacionais com a presença de Bd. Por outro lado, há na literatura relatos de declínios de populações de anfíbios anuros de altitude no mesmo período, mas em diferentes locais (WEIGGOLDT, 1989; POMBAL; HADDAD, 1999). Segundo Carnaval e colaboradores (2006), o mais antigo caso de infecção por Bd conhecido no Brasil foi relatado em um espécime de anuro colhido em 1981 no Rio de Janeiro e depositado em coleção museológica. Frente a esta informação, estes autores sugerem que os declínios relatados podem ter alguma relação com o aparecimento do Bd.

No presente trabalho, o método diagnóstico empregado foi a PCR convencional, com a qual a prevalência observada foi de 19,1%. Porém, estruturas compatíveis com Bd foram observadas histologicamente em apenas 2,6% (3/114) dos animais analisados. Ainda, em apenas em 13,6% (3/11) dos animais positivos na PCR visualizou-se estruturas compatíveis com Bd na epiderme. Finalmente, todos os animais positivos para Bd no exame histopatológico foram positivos também no exame de PCR.

Os resultados acima indicados corroboram as informações existentes na literatura quanto à suscetibilidade dos métodos diagnósticos empregados em nosso trabalho (PESSIER, 2008). A histopatologia é considerada um método diagnóstico útil em caso de infecções severas. No caso de infecções discretas, por conta de características do próprio método, o uso de histopatologia implica na ocorrência de um grande número de falsos negativo (PESSIER et al., 1990). Em um trabalho realizado por Puschendorf e Balaños (2006), verificou-se que foram necessários no mínimo 17 cortes histológicos dos locais mais prováveis de se encontrar o fungo para que houvesse uma confiabilidade maior do que 95% no resultado dos exames de *Eleutherodactylus fitzingeri* infectados naturalmente. Dentre os locais com maior probabilidade de se encontrar o fungo, a região ventral do abdômen e o dedo interno das patas anteriores são os mais indicados para colheita das amostras para o exame histopatológico.

Segundo alguns autores, as melhores técnicas para detectar o fungo são os ensaios moleculares de PCR *real time* (qPCR) e PCR convencional, sendo o primeiro tido como o mais sensível (ANNIS, 2004; BOYLE, 2004). cremos que, analisando aspectos de custo x benefício (especificidade, sensibilidade, custo operacional, praticidade e investimento inicial em equipamentos), a técnica do *nested* PCR mostra-se como uma opção diagnóstica vantajosa, uma vez que não necessita de equipamento distinto do utilizado no PCR convencional e apresenta resultados sólidos e confiáveis.

Em nosso trabalho, as amostras de material biológico para os testes moleculares foram obtidas através do uso de swabs estéreis de algodão com haste de plástico ou alumínio. Porém, segundo Pessier, o mais indicado atualmente é o uso de swabs de material sintético, como o ryon, e haste de plástico ou alumínio, para diminuir a chance de contaminação pelo material orgânico do algodão ou da haste de madeira, que podem interferir nos resultados moleculares (comunicação pessoal)³. Esta informação sinaliza a necessidade de serem realizadas, pelo menos de forma amostral, novos ensaios nos locais pesquisados em nosso trabalho, tendo como ferramenta de colheita os swabs acrílicos com hastes de alumínio, para avaliar se a prevalência encontrada pode ter sofrido alguma forma de influência por conta do swab empregado.

Ainda segundo Pessier, a conservação ideal do swabs para o PCR deve ser sem adição de nenhum conservante, mantendo-os na temperatura mais baixa possível (comunicação pessoal)³. No entanto, ainda segundo o mesmo pesquisador, devido às condições adversas que existem nos trabalhos de campo, onde muitas vezes não há como manter os swabs a baixas temperaturas, é possível manter os swabs em álcool absoluto. No presente trabalho, os swabs foram conservados em álcool absoluto e mantidos a baixas temperaturas, procedimentos que em nossa opinião contribuíram para a preservação de material adequado para a detecção de Bd em, pelo menos, parte das amostras. Porém, não se pode afirmar que os cuidados tomados eliminaram completamente a possibilidade da ocorrência de falsos negativos. Mais uma vez, trabalhos complementares, valendo-se de métodos variados de colheita e conservação, são recomendados para que seja possível

³ Informação fornecida por Pessier em São Paulo, 2011

termos um panorama mais claro das possibilidades e limitações das técnicas existentes.

Nos exames histopatológicos dos espécimes da Boracéia nos quais foram encontradas estruturas compatíveis com Bd, não se observou uma resposta inflamatória associada ao fungo. Tal resultado corrobora a literatura existente que cita não ser a inflamação um achado frequentemente associado ao fungo (BERGER et al., 1998, 1999; PESSIER et al., 1999; BERGER et al., 2005).

A presença do fungo na Boracéia reforça a urgência para que sejam rapidamente implantadas as medidas preventivas necessárias com vistas a minimizar as possibilidades de disseminação do agente para novos hospedeiros e ambientes. Desta forma, em consonância com as recomendações preconizadas nos manuais especializados, sugere-se o uso de luvas descartáveis para o manuseio dos animais, tomando-se o cuidado de trocar as luvas para cada novo indivíduo manipulado, além da desinfecção com amônia quartenária das botas e equipamentos utilizados na Estação Biológica da Boracéia (JOHNSON et al., 2003a; WEBB et al., 2007; PESSIER; MENDELSON, 2010).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho investigou a ocorrência de infecções e/ou processos mórbidos de origem bacteriana, parasitária e fúngica em anfíbios anuros da Estação Biológica da Boracéia. Em especial, foram pesquisadas infecções causadas por parasitas metazoários e pelo Bd. Para tanto, valemo-nos de ensaios diagnósticos anátomo-patológicos, microbiológicos, parasitológicos e moleculares. No nosso conhecimento, trata-se da primeira investigação do perfil sanitário de uma população de anfíbios anuros de vida livre realizada no Brasil.

Os animais analisados, em sua grande maioria, não apresentaram sinais clínicos, tampouco alterações macroscópicas ou microscópicas relevantes. Excetuando-se os casos sugestivos de contaminação bacteriana decorrentes de procedimentos laboratoriais inapropriados, não foram isoladas bactérias nas hemoculturas realizadas. Por outro lado, 45,8% (55/120) e 19,1% (22/115) dos anuros estudados apresentavam alguma forma de parasitismo e infecção pelo Bd, respectivamente.

Os Nematódeos foram o grupo de metazoários mais encontrado nos exames macroscópicos. Dentre estes, destacaram-se os generos *Oxyascaris*, *Aplectana*, *Cosmocerca*, *Oswaldocruzia*, *Pterascaris* e *Rhabdias*. Dentre os cestóides, foram identificados apenas *Plerocercoides*. Infelizmente, não foi possível alcançar a identificação ao nível de espécie dos parasitas colhidos. Considerando que o conhecimento sobre os parasitas que infectam um determinado animal pode trazer informações valiosas sobre as saúdes animal e ambiental, julgamos relevante a elaboração de projetos que visem caracterizar, de forma segura, as espécies de parasitas que acometem os anfíbios anuros de vida livre.

Nosso trabalho demonstrou, por meio de provas moleculares e histopatológicas, que o Bd está presente em anfíbios anuros da Boracéia nos dois principais rios que cortam a reserva. Apesar de não ser ainda possível inferir com maior segurança o significado e dimensão deste resultado, trata-se de uma informação que necessita ser enfocada com extrema atenção, haja vista o reconhecido potencial devastador que este fungo tem para várias espécies de anuros. Primeiramente, e considerando

de forma exclusiva a região da Boracéia, julgamos imprescindível investigar a exata distribuição e abrangência da infecção em toda a região da estação. Outro ponto que requer pronta ação é o estabelecimento de protocolos sanitários rígidos, com vistas a impedir a disseminação do fungo para outras áreas e animais da Estação.

A somatória dos resultados aqui exibidos sugere que, nas condições específicas deste trabalho, os agentes identificados não induziram processos patológicos relevantes, sinalizando uma relação hospedeiro x parasita simétrica. Porém, face ao frágil equilíbrio existente no ambiente da Mata Atlântica e a suscetibilidade dos anfíbios às mudanças dos ecossistemas, cremos que monitoramentos de longo prazo sejam necessários para que se possa acompanhar, com alguma margem de segurança, a evolução desta delicada relação.

No Brasil, devido a sua importância comercial, a maior parte da literatura relativa a doenças de anfíbios reflete processos acometendo rã touro gigante, *L. catesbianus*. Hipólito e Bach (2002) produziram extensa revisão sobre a bibliografia já publicada em relação às principais enfermidades descritas nessa espécie. Em particular, há vários trabalhos descrevendo parasitas (Anexo B), sem, porém prover informações a respeito de associação com alterações patológicas.

A carência de informações sobre os agentes patológicos envolvendo os anfíbios anuros, e em especial sobre os processos mórbidos decorrentes, ratifica a necessidade de pesquisas mais detalhadas sobre o tema. É sabido que os agentes infecciosos podem ter importante papel nos processos de seleção natural das espécies, assim como na distribuição espacial destas. À medida que as populações vão ficando menores e mais ameaçadas, maior é a importância de se estudar fatores que possam impactar a sobrevivência de nossa rica biodiversidade (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000). A diminuição das populações de vida livre tem levado ao desenvolvimento de projetos e conservação *ex situ*, com o objetivo de se tentar salvaguardar algumas espécies ameaçadas de extinção. O conhecimento e o entendimento das enfermidades que acometem estes animais são importantes para o sucesso da manutenção dos mesmos em cativeiro.

As enfermidades infecciosas são apenas um dos fatores que causam declínios de anfíbios no mundo todo. Além das doenças, há, sabidamente, diversas outras causas possíveis, incluindo a destruição de habitats, mudanças climáticas,

alterações de UVA e UVB, contaminantes e introdução de espécies. Tais fatores podem, ou não, atuar de forma convergente e associada (BLAUSTEIN; KIESECKER, 2002). No Brasil, a principal causa dos declínios das populações de anfíbios é a destruição de habitats pelo desmatamento, conversão de terras para agropecuária, mineração, fogo, obras de infra-estrutura e urbanização (SILVANO; SEGALLA, 2005).

Portanto, cremos que sejam necessários esforços e trabalho conjunto de várias áreas de conhecimento para que haja um maior conhecimento e entendimento de nossa fauna de anfíbios em todos os seus aspectos. Somente com esta abordagem será possível avançarmos para a elaboração e efetivação de medidas eficientes de proteção destes intrigantes animais e dos seus habitats.

REFERÊNCIAS

AISIEN, M. S. O.; OGOANNAH, S. O.; LMASUEN, A. A. Helminth parasites of amphibians from a rainforest reserve in Southwestern, Nigeria. **African Zoology**, v. 22, n.1, p.1-7, 2009.

ALEMU, J. B.; CAZABON, M. N. E.; DEMPEWOLF, L.; HAILEY, A.; LEHTINEN, R. M.; MANNETTE, R. P.; NARANJIT, K. T.; ROACH, C. J. Presence of the Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in populations of the Critically Endangered Frog *Mannophryne olmonae* in Tobago, West Indies. **Ecohealth**, v. 5, n. 1, p. 34-39, 2008.

ALICATA, J. E. The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. **Parasitology Today**, v. 7, p. 150–153, 1991.

ANNIS, S. L.; DASTOOR, F. P.; ZIEL, H.; DASZAK, P.; LONGCORE, J. E. A DNA based assay identifies *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibians. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 3, p. 420-428, 2004.

BAI, C.; GARNER, T. W. J.; LI, Y. First evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: discovery of chytridiomycosis in introduced American Bullfrogs and native species in the Yunnan Province, China. **Ecohealth**, v. 7, n. 1, p. 127-134, 2010.

BARDSLEY, J. E.; HARMSSEN, R. The trypanosomes of Anura. **Advances in Parasitology**, v. 11, n. 2, p. 1-73, 1973.

BARROS, G. C.; LANGENEGGER, C. H.; PEIXOTO, P. V. Surto de micobacteriose em criação de rãs (*Rana catesbiana*) causada por *Micobacterium marinum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.8, n. 3/4, p.75-80, 1988.

BARROS, G. C.; LANGENEGGER, C. H.; PEIXOTO, P. V. Surto de micobacteriose em criação de rãs (*Rana catesbiana*) causada por *Micobacterium marinum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.8, n. 3/4, p.75-80, 1988.

BEAR, K. H.; O'NEILL, E. M. infection of an invasive frog *Eleutherodactylus coqui* by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hawaii. **Biological Conservation**, v. 126, p. 591-595, 2005.

BERGER, L.; HYATT, A. D.; OLSEN, V.; HENGSTBERGER, S. G.; BOYLE, D.; MARANTELLI, G.; HUMPREYS, K.; LONGCORE, J. Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 48, n. 3, p. 213-220, 2002.

BERGER, L.; MARANTELLI, G.; SKERRAT, L. F.; SPEARE, R. Virulence of the amphibian chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* varies with the strain. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, n. 1, p. 47-50, 2005.

BERGER, L.; SPEARE, R.; DASZAK, P.; GREEN, D. 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. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with populations declines in the rain Forest of Austrália and Central America. **Theoretical Population Biology**, v. 95, n. 15, p. 9031-9036, 1998.

BERGER, L.; SPEARE, R.; MARANTELLI, G.; SKERRAT, L. F. A technique to evaluate the activity of antifungal compounds against *Batrachochytrium dendrobatidis* and unsuccessful treatment of experimental infected green tree frogs (*Litoria caerulea*) by fluconazole and benzalconium chloride. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 106-110, 2009.

BERGER, L.; VOLP, K.; MATHEWS, S.; SPEARE, R.; TIMMS, P. *Chlamydia pneuminae* in free ranging giant barred frog (*Myxophyes iterates*) from Australia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2378-2380, 1999.

BERTOLUCI, J.; HEYER, W. R. Boracéia update. **Froglog** v. 14, n. 3, 1995.

BLAUSTEIN, A. R. Chicken little or Nero's fiddle: a perspective on declining amphibian populations. **Herpetologica**, v. 50, n. 1, p. 85-97, 1994.

BLAUSTEIN, A. R.; KIESECKER, J. M. Complexity in conservation: lessons from the global decline of amphibian populations. **Ecological Letters**, v. 5, n. 4, p. 597-608, 2002.

BLAUSTEIN, A. R.; ROMANSIC, J. M.; SCHEESSELE, E. A.; HAN, B. A.; PESSIER, A. P.; LONGCORE, J. E. Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Conservation Biology**, v. 19, n. 5, p. 1460-1468, 2005.

BLUMER, C.; ZIMMERMANN, C.; WEILENMANN, R.; VAUGHAN, L.; POSPISCHIL, A. Chlamydiae in free ranging and captive frogs in Switzerland. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 2, p. 144-150, 2007.

BODETTI, T. J.; JACOBSON, E. R.; WAN, C.; HAFNER, L.; POSPISCHIL, A.; ROSE, K.; TIMMS, P. Molecular evidence to support the expansion of host range of *Chlamydomphila pneumonia* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 146-152, 2002.

BOQUIPANI-FREITAS, L.; VRCIBRADIC, D.; VICENTE, J. J.; BURSEY, C. R.; ROCHA, C. F. D.; SLUYS, M. V. Helminths of the horned leaf frog, *Proceratophrys appendiculata*, from southeastern Brazil. **Journal of Helminthology**, Cambridge, v. 75, n. 3, p. 233-236, 2001.

BORTEIRO, C.; CRUZ, J. C.; KOLENC, F.; ARAMBURU, A. Chytridiomycosis in frogs from Uruguay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 84, n. 2, p. 159-162, 2009.

BOULIANNE, B. A. B.; EVANS, R. C.; SMITH, T. G. Phylogenetic analysis of Hepatozoon species (Apicomplexa: Adeleorina) infecting frogs of Nova Scotia, Canada, determined by ITS-1 sequences. **Journal of Parasitology**, v. 93, p. 1435-1441, 2007.

BOURKE, J.; MUTSCHMANN, F.; OHST, T.; ULMER, P.; GUTSCHE, A.; BUSSE, K.; WERNING, H.; BOEHME. *Batrachochytrium dendrobatidis* in Darwin's frog *Rhinoderma spp.* in Chile. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 92, n. 2-3, p. 217-221, 2010.

BOYLE, D. G.; BOYLE, D. B.; OLSEN, V.; MORGAN, J. A. T.; HYATT, A. D. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real time Taqman PCR assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 60, n. 2, p. 141-148, 2004.

BRADLEY, G. A.; ROSEN, P. C.; SREDL, M. J.; JONES, T. R.; LONGCORE, J. E. Chytridiomycosis in native Arizona frogs. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 1, p. 206-212, 2002.

BURKE, J.C. Presença de **Batrachochytrium dendrobatidis** em anuros de vida livre, sem lesões aparentes, do município de Boracéia, SP. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Imunopatologia Veterinária, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista - UNIP). São Paulo. 49p., 2011.

IBMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Instrução Normativa n.3 de 27 de maio de 2003. Lista das espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 maio 2003. nº 101, sec. 1, p. 88-97.

BUDISCHAK, S. A.; BELDEN, L. K.; HOPKINS, W. S. A. Effects of malathion on embryonic development and latent susceptibility to trematode parasites in ranid tadpoles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 2496-2500, 2008.

CAMPIÃO, K. M.; SILVA, J. R.; FERREIRA, V. L. Helminth component community of the paradoxal frog *Pseudis platensis* Gallardo, 1961 (Anura:Hylidae) from south-eastern Pantanal, Brazil. **Parasitological Research**, v. 106, n. 3, p. 747-751, 2010.

CAMPIÃO, K. M.; SILVA, R. J.; FERREIRA, V. L. Helminth parasites of *Leptodactylus podicipanus* (Anura:Leptodactylidae) from Southeastern Pantanal, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 83, n. 4, p. 345-349, 2009.

CARNAVAL, A. C. O. Q.; PUSCHENDORF, R.; PEIXOTO, O. L.; VERDADE, V. K.; RODRIGUÊS, M.T. Amphibian chytrid fungus broadly distributed in the Brazilian Atlantic Rain Forest. **Ecohealth**, v. 3, n. 1, p. 41-48. 2006.

CARNAVAL, A. C. O. Q.; TOLEDO, L. F.; HADDAD, C. F. B.; TOLEDO, L. F.; BRITTO, F. B. Chytrid fungus infect high-altitude stream-dwelling *Hylodes magalhaesi* (Leptodactylidae) in the Brazilian Atlantic Rain Forest. **Frog Log**, v. 70, p. 3-4, 2005.

CATÃO-DIAS, J. L.; CARVALHO, V. M.; SENHORINI, I.; COUTINHO, S. D.; MATUSHIMA, E. R.; COSTA, E. O. Surto de saprolegniose em girino de *Rana catesbiana*. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 19, n. 4, p. 432-437, 1988.

CATENAZZI, A.; LEHR, E.; RODRIGUEZ, L. O.; VREDENBURG, V. T. *Batrachochytrium dendrobaridis* and the collapse of anuran species richness and abundance in the upper Manu National Park, Southeast Peru. **Conservation Biology**, v. 25, n. 2, p. 382-391, 2011.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E. V.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animal: part 2. **Laboratory Animals**, v. 31, n. 1, p. 1-32, 1997.

CRAWSHAW, G. J. Amphibian medicine. In: FOWLER, M. E. **Zoo and wild animal medicine, current therapy 3** Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993. p. 131-138.

DARE, O. K.; FORBES, M. R. Rates of development in male and female of wood tree frogs and patterns of parasitism by lung nematodes. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 385-393, 2008.

DASZAK, P.; BERGER, L.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D.; GREEN, D. E.; SPEARE, R. Emerging infectious disease and amphibian population declines. **Emerging Infectious Disease**, v. 5, n. 6, p. 735-748, 1999.

DAZSAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious disease of wildlife – threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, p. 443-449, 2000.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Infectious diseases and amphibian population decline. **Diversity and Distribution**, v. 9, n. 2, p.141-150, 2003.

DASZAK, P.; STRIEBY, A.; CUNNINGHAM, A. A.; LONGCORE, J. E.; BROWN, C. C.; PORTER, D. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. **Herpetological Journal**, v. 14, n. 4, p. 201-207, 2004.

DE PAULA, C. D.; ASSIS, E. C. P.; CATÃO-DIAS, J. L. *Chytridiomycosis* in captive *Dendrobates tinctorius* (Anura: Dendrobatidae) in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DISEASES OF ZOO AND WILD ANIMALS, 2010, Madrid. **Proceedings...** Madrid, 2010. v.1, p.167-168.

DESSER, S. S.; HONG, H.; MARTIN, D. S. The life history, ultrastructure, and experimental transmission of *Hepatozoon catesbeianae* n. comb., an apicomplexan parasite of the bullfrog, *Rana catesbeiana* and the mosquito, *Culex territans* in Algonquin Park, Ontario. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 212–222, 1995.

DORNY, P.; PRAET, N.; DECKERS, N.; GABRIEL, S. Emerging food borne parasites. **Veterinary Pathology**, n. 3, p.196-206, 2009.

DRESSER, S. S. The blood parasites from Costa Rica with reflections on the taxonomy of trypanosomes. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 1, p.152-160, 2001.

DUNCAN, A. E.; GARNER, M. M.; BARTHOLOMEU, J. L. Renal myxosporidiosis in Asian horned frog (*Megophrys nasuta*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n. 3, p. 381-386. 2004.

EIRAS, J. C. An overview on the myxosporean parasites in amphibian and reptiles. **Acta Parasitologica**, v. 50, n. 4, p. 167-275, 2005.

ELDRIDGE, N. **Life in balance**: humanity and the biodiversity in crises. New Jersey: Princeton University Press, 1998. 240 p.

ELLS, T. V.; STANTON, J.; STRIEBY, A.; DASZAK, P.; HYATT, A. D.; BROWN, C. Use of immunohistochemistry to diagnose chytridiomycosis in Dyin Poison Dart Frogs (*Dendrobates tinctorius*). **Journal of Wildlife Disaeses**, v. 39, n. 3, p. 742-745, 2003.

ETEROVICK, P. C.; CARNAVAL, A. C. O. Q.; BORGES-NOJOSA, D. M.; SILVANO, D. L.; SEGALLA, M. V.; SAZIMA, I. Amphibian declines in Brazil: an overview. **Biotropica**, v. 37, n. 2, p. 166-179, 2005.

FERREIRA, R.; FONSECA, L. S.; AFONSO, A. M.; SILVA, M. G.; SAAD, M. H.; LILENBAUM, W. A report of mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marinum* in bullfrogs (*Rana catesbiana*). **Veterinary Journal**, v. 171, n. 1, p. 171-180, 2006.

FISHER, M. C.; GARNER, T. W. J. The relationship between the emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis*, the wildlife trade in amphibians and introduced amphibian species. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 2-9, 2007.

FISHER, M. C. Endemic and introduced haplotypes of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Japanese amphibians: sink or source? **Molecular Ecology**, v. 18, n. 23, p. 4731-4733, 2009.

FORZAN, M. J.; GUNN, H.; SCOTT, P. Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs: diagnosis, treatment, and control. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 39, n. 3, p. 406-411, 2008.

FRENKEL, J. K.; HARMAN, W. J. Allodera hylae, an endoparasitic worm (Naididae, Oligochaeta, Annelida) from a Colombian poison dart frog, *Dendrobates histrionicus*, ureteral and cloacal habitat and visceral migration. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PARASITOLOGY, 30., 1985, New Orleans. **Proceedings...**New Orleans: American Society of Parasitology, 1985. p. 36.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. INPE. IBAMA. **Atlas dos remanescentes florestais do domínio da Mata Atlântica**. São Paulo: Editora São Paulo, 1999. Disponível em: http://mapas.sosma.org.br/site_media/download/mapas_a1/brasil_A1.pdf. Acesso em: 28 abr. 2011.

GARDNER, C. H.; FAYER, R.; DUBEY, J. P. In: **An atlas of protozoan parasite in animal tissues**. 2. ed. Washington, D.C: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 1998. 84 p.

GARDNER, C. H.; POYNTON, S. L. **An atlas of metazoan parasites in animal tissues**. Washington, D.C: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 1999. 64 p.

GARDNER, T. Declining amphibian populations: global phenomenon in conservation biology. **Animal Biodiversity Conservation**, v. 24, n. 2, p. 25-44, 2001.

GARLAND, S.; BAKER, A.; PHILLOTT, A. D.; SKERRATT, L. F. BSA reduces inhibition in a TaqMan assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 2-3, n. 9, p. 113-116, 2010.

GARNER, T. W. J.; PERKINS, M. W.; GOVINDARAJULU, P.; SEGLIE, D.; WALKER, S.; CUNNINGHAM, A. A.; FISHER, M. C. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects populations of the North American bullfrog, *Rana Catesbeiana*. **Biology Letters**, v. 2, n. 3, p. 455-459, 2006.

GARNER, T. W. J.; STEPHEN, I.; WOMBWELL, E.; FISCHER, M. C. The amphibian trade: bans or best practice? **Ecohealth**, v. 6, n. 5, p. 148-151, 2009.

GIOVANELLI, J. G. R.; HADDAD, C. F. B.; ALEXANDRINO, J. Predicting the potential distribution of the alien invasive American bullfrog in Brazil. **Biological Invasions**, v. 10, n. 5, p. 585-590, 2007.

GODFREY, D.; WILLIAMSON, H.; SILVERMAN, J.; SMALL, P. L. C. Newly identified *Mycobacterium* species in a *Xenopus laevis* colony. **Comparative Pathology**, v. 57, n. 1, p. 97-104, 2007.

GOKA, K.; YOKOYAMA, J.; UNE, Y.; KUROKI, T.; SUZUKI, K.; NAKAHARA, M.; KOBAYASHI, A.; INABA, S.; MIZUTANI, T.; HYATT, A. D. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distributions, haplotypes and possible route of entry into Japan. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 22, p. 4757-4774, 2009.

GOLDBERG, S. R.; BURSEY, C. R. Helminth biodiversity of Costa Rican Anurans (Amphibia: Anura). **Journal of Natural History**, v. 44, n. 29/20, p. 1755-1787, 2010.

GOLDBERG, S. R.; BURSEY, C. R.; CALDWELL, J. P.; VITT, L. J.; COSTA, G. C. Gastrointestinal helminths from six species of frogs and three species of lizards, sympatric in Pará State. Brazil. **Comparative Parasitology**, v. 74, n. 2, p. 327-342, 2007.

GONÇALVES, A. Q.; VICENTE, J. J.; PINTO, R. M. Nematodes of Amazonian vertebrates deposited in the helminthological collection of the Oswaldo Cruz Institute with new records. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 2, p. 453-465, 2002.

GREEN, S. L.; LIFLAND, B. D.; BOULEY, D. M.; BROWN, B. A.; WALLACE JR., R. J.; FERREL JR., J. E. Disease attributed to *Mycobacterium chelonae* in South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Comparative Medicine**, v. 50, n. 6, p. 675-679, 2000.

GRIFFITHS, R. A.; PAVAJEAU, L. Captive breeding, reintroductions and the conservation of amphibians. **Conservation Biology**, v. 22, n. 4, p. 852-861, 2008.

HADDAD, C. E. B. Biodiversidade dos anfíbios no Estado de São Paulo. In: CASTRO, R. M. C. (Ed.). **Biodiversidade no Estado de São Paulo, Brasil**. São Paulo: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 1998. p. 16-26. (Série Vertebrados).

HADFIELD, C. A.; WHITAKER, B. R. Amphibian emergency medicine and care. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 14, n. 2, p. 79-89, 2005.

HAMILTON, P. B.; GIBSON, W. C.; STEVENS, J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 15-25, 2007.

HARP, E. M.; PETRANKA, J. N. Ranavirus in wood frog (*Rana sylvatica*): potential source of transmission within and between ponds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 307-318, 2006.

HARRIS, R. N.; JAMES, T. Y.; LAUER, A.; SIMON, M. A.; PATEL, A. Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. **Ecohealth**, v. 3, n. 1, p. 53-56, 2006.

HERRERA, R. A.; STECIOW, M. M.; NATALE, G. S. Chytrid fungus parasitizing the wild amphibian *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae) in Argentina. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 64, n. 3, p. 247-252, 2005.

HEYER, W. R.; RAND, A. S.; CRUZ, C. A. G.; PEIXOTO, O. L. Decimations, extinctions, and colonization of frog populations in southeast Brazil and their evolutionary implications. **Biotropica**, v. 20, n. 3, p. 230-235, 1988.

HEYER, W. R.; RAND, A. S.; CRUZ, C. A. G. Frogs of boracéia. **Arquivos de Zoologia**, v. 31, n. 4, p. 1-181, 1990.

HOLLAND, M. P.; SKELLY, D. K.; KASHGARIAN, M.; BOLDEN, S. R.; HARRISON, L. M.; CAPPELLO, M. Echinostome infection in green frogs (*Rana clamitans*) is stage and age dependent. **Journal of Zoology**, v. 271, p. 455-462, 2007.

HOLMES, R. M.; BOCHIGLIERI, A.; CALDEIRA DE ARAÚJO, F. R. R.; SILVA, R. J. New records of endoparasites infecting *Hypsiboas albopunctatus* (Anura:Hylidae) in a savanna area in Brasília, Brazil. **Brazilian Parasitological Research**, v. 102, n. 4, p. 621-623, 2008.

HOULAHAN, J. E.; FINDLAY, C. S.; SCHMIDT, B. R.; MEYER, A. H.; KUZMIN, S. L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 752-755, 2000.

HOWERTH, E. W. Pathology of naturally occurring chlamydiosis in African clawed frog (*Xenopus laevis*). **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 1, p. 28-32, 1984.

HYATT, A. D.; BOYLE, D. G.; OLSEN, V.; BOYLE, D. B.; BERGER, L.; OBENDORF, D.; DALTON, A.; KRIEGER, K.; HERO, M.; HINES, H.; PHILLOTT, R.; CAMPBELL, R.; MARANTELLI, G.; GLESON, F.; COLLING, A. Diagnostics assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 73, n. 3, p. 175-192, 2007.

HUDSON, P. J.; RIZZOLI, A.; GRENFELL, B. T.; HEESTERBEEK, H.; DOBSON, A. P. **The Ecology of wildlife diseases**. New York: Oxford University Press, 2002. 197 p.

IUCN. INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. **IUCN Red list of threatened species**. Versão 2011.1, 2011. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 30 maio 2011.

JAMES, T. Y.; LITVINTSEVA, A.; VILGAYS, R.; MORGAN, J. A. T.; TAYLOR, J. W.; FISHER, M. C.; BERGER, L.; WELDON, C.; PREEZ, L. D.; LONGCORE, J. E. Rapid expansion of an emerging fungal disease into declining and healthy amphibian population. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 5, 2009. Disponível em <<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000458>>. Acesso em: 02 jan. 2011.

JIRKÚ, M.; MODRÝ, D. Extra-intestinal localization of *Goussia* sp. (Apicomplexa) oocysts in *Rana dalmatina* (Anura: Ranidae), and the fate of infection after metamorphosis. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 70, n. 3, p. 237-241, 2006.

JOHNSON, M. L.; BERGER, L.; PHILIPS, L.; SPEARE, R. Fungicidal effects of chemicals disinfectants, UV light, dessication and heat on the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 57, n. 3, p. 255-260, 2003a.

JOHNSON, M. L.; SPEARE, R. Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and disease control implication. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 922-925, 2003.

JOHNSON, P. T. J.; CHASE, J. M. Parasites in the food web: linking amphibian malformation and aquatic eutrophication. **Ecological Letters**, v. 7, n. 7, p. 521-526, 2004.

JOHNSON, P. T. J.; LUNDE, K. B.; ZELMER, D. A.; WERNER, J. K. Limb deformities as an emerging parasitic disease en amphibians: evidence from museum specimens and resurvey data. **Conservation Biology**, v. 17, n. 6, p. 1724-1737, 2003b.

KEISER, J.; UTZINGER, J. Emerging foodborne trematodiasis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1507-1514, 2005.

KIELGAST, J.; RODDER, M.; VEITH, M.; LOTTERS, S. Widespread occurrence of the amphibian chytrid fungus in Kenya. **Animal Conservation**, v. 13, n. 1, p. 36-43, 2010.

KIESECKER, J. M.; BLAUSTEIN, A. R. Synergism between UV-B radiation and a pathogen magnifies amphibian embryo mortality in nature. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 92, n. 24, p. 11049-11052, 1995.

KIESECKER, J. M.; BLAUSTEIN, A. R.; BELDE, L. K. Complex causes of amphibian population declines. **Nature**, v. 410, n. 6829, p. 681-684, 2001.

KLAPHAKE, E. Bacterial and parasitic diseases of amphibians. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 3, p. 597-608, 2009.

KOPRIVNIKAR, J.; FROBES, M. R.; BAKER, R. L. Contaminants effects on host-parasite interactions: atrazine, frogs and trematodes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2166-2170, 2007.

KRIGER, K. M.; HERO, J. M.; ASHTON, K. Cost efficiency in the detection of chytridiomycosis using PCR assay. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 71, n. 2, p. 149-154, 2006.

KUSRINI, M. D.; SKERATT, L. F.; GARLAND, S.; BERGER, L.; ENDARWIN, W. Chytridiomycosis in frogs of Mount Gede Pangrango, Indonesia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 82, n. 3, p. 187-194, 2008.

LANGE, M. C. Composição e variação estacional da anurofauna de folheto da Estação Biológica da Boracéia. In: CONGRESSO DE ZOOLOGIA, 25., [Brasília]. **Resumos**. 2006.

LAURENCE, W. F.; MCDONALD, K. R.; SPEARE, R. Epidemic Disease and the catastrophic decline of Australian Rain Forest Frogs. **Conservation Biology**, v. 10, n. 2, p. 406-413, 1996.

LEE, S.; ZIPPEL, K.; RAMOS, L.; SEARLE, J. Caotive breeding programme for the Kihansi spray toad *Nectophrynoides asperginis* at the Wildlife Conservation Society, Bronx, New York. **International Zoo Yearbook**, v. 40, n.1, p. 241-253, 2006.

LIOU, N.S. História natural de duas espécies simpátricas de *Enyalius* (Squamata, Leiosauridae) na Mata Atlântica do sudeste brasileiro. 107f. Dissertação, Instituto de Biologia, Universidade de São Paulo, SP. 2008⁴

LIPS, K. R. Decline of a tropical montane amphibian fauna. **Conservation Biology**, v. 12, n. 1, p. 106-117, 1998.

⁴ Rossi, M. Fatores formadores de paisagem litorâneas: a baía do Guaratuba. Tese (Doutorado em Geografia), FFLCH, USP, São Paulo, 1999.

LIPS, K. R.; MENDELSON, J. R.; MUÑOZ-ALONSO, A.; CANSECO-MÁRQUEZ, L.; MULCAHY, D. G. Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurvey on historical localities. **Biological Conservation**, v. 119, n. 4, p. 555-564, 2004.

LOM, J.; DYKOVA, I. **Protozoan parasites of fishes**. Amsterdam e New York: Elsevier. 1992. 315 p.

LONGCORE, J. E.; PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et. sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. **Mycologia**, v. 91, n. 2, p. 219-227, 1999.

LOPEZ, L. C. S.; FILIZOLA, B.; DEISS, I.; RIOS, R.I. Frogs and snakes as phoretic dispersal agents of bromeliad ostracods (Limnocytheridae: *Elpidium*) and annelids (Naididae: *Dero*). **Biotropica**, v. 31, n. 4, p. 15-22, 1999.

LUQUE, J. L.; MARTINS, A. N.; TAVARES, L. E. R. Community structure of metazoan parasites of the yellow Cururu toad, *Bufo ictericus* (Anura: Bufonidae) from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 50, n. 3, p. 215-220, 2005.

LV, S.; ZHANG, Y.; STEINMANN, P.; ZHOU, X. N. Emerging angiostrongyliasis in mainland China. **Emerging Infections Diseases**, v. 14, n. 1, p. 161-164, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/EID/content/14/1/161.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

MARCUM, R. D.; ST-HILAIRE, S.; MURPHY, P. J.; RODNICK, K. J. Effects of *Batrachochytrium dendrobatidis* infection on ion concentrations in the boreal toads *Anaxyrus (Bufo) boreas boreas*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 91, n. 1, p. 17-21, 2010.

MARANTELLI, G.; PARKES, H. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with populations declines in the rain Forest of Austrália and Central America. **Theoretical Population Biology**, Roskilde, v. 95, n.15, p. 9031-9036, 1998.

MARTEL, A.; ROOIJ, P. V.; VERCAUTEREN, G.; BAERT, K.; VAN WAEYENBERGHE, L.; DEBACKER, P.; GARNER, T. W. J.; WOELTJES, T.;

DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. **Medical Mycology**, v. 49, n. 2, p. 143-149, 2011.

MATUSHIMA, E. R. Técnicas necroscópicas. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2007. p. 980-990.

MCALLISTER, C. T.; BURSEY, C. R.; FREED, P. S. Helminth parasites (Cestodea: Nematoda) of selected herpetofauna from Paraguay. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 222-224, 2010b.

MCALLISTER, C. T.; BURSEY, C. R.; FREED, P. S. Helminth parasites (Cestoidea, Nematoda, Pentastomida) of selected herpetofauna from Camerron, West Africa. **Acta Parasitologica**, v. 55, n. 1, p. 90-93, 2010e.

MCALLISTER, C. T.; BURSEY, C. R.; FREED, P. S. Helminth parasites from selected amphibians and reptiles from Republic of Ecuador. **Comparative Parasitology**, v. 77, n. 1, p. 52-66, 2010d.

MCALLISTER, C. T.; BURSEY, C. R.; FREED, P. S. Helminth parasites of amphibians and reptiles from the Ucayali region, Peru. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 444-447, 2010a.

MCALLISTER, C. T.; BURSEY, C. R.; FREED, P. S. Helminth parasites of selected herpetofauna from the Rapunini district, Soutjwestern Guyana. **Comparative Parasitology**, v. 77, n.2, p. 184-210, 2010c.

MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; MITTERMEIER C. G. **Hotspots**: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecosystems. Washington: CEMEX, 1999. 432 p.

MUTSCHMANN, F. A new myxozoan, *Chloromyxum careni* sp. n. (Myxosporea: Chloromyxidae) from the kidney of *Megophrys nasuta*, Schelgel, 1858 (Anura: Pelobatidae) from Indonesia. **Acta Protozoologica**, v. 38, n. 5, p. 83-86, 1999.

MUTSCHMANN, F. Pathological changes in African hyperoliid frogs due to a myxosporidian infection with a new species of *Hoferellus* (Myxozoa). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 60, n. 3, p. 215-222, 2004.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

ORRICO, V. G. D.; MONGIN, M. M.; CARVALHO E SILVA, A. M. P. T. The tadpole of *Hypsiboas lalistriatus* (Caramaschi & Cruz, 2004), a species of the *Hypsiboas polytaenius* (Cope, 1870) clade (Amphibia, Anura, Hylidae). **Zootaxa**, v. 1531, p. 25-37, 2007.

OUELLET, M.; MIKAELIAN, I.; PAULI, B.; RODRIGUES, J.; GREEN, D. M. Historical evidence of widespread chytrid infection in North American amphibian populations. **Conservation Biology**, v. 19, n. 5, p. 1431-1440, 2005.

PARKER, J. M.; MIKAELIAN, I.; HAHN, N.; DIGGS, H. E. Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). **Comparative Medicine**, v. 52, n. 3, p. 265-268, 2002.

PASTERIS, S. E.; BUHLER, M. I.; NADER-MACIAS, M. E. Microbiological and histological studies of farmed bullfrog *Rana catesbiana* tissues displaying red-leg syndrome. **Aquaculture**, v. 251, n. 1, p. 11-18, 2006.

PESSIER, A. P. Management of diseases as a threat to amphibian conservation. **International Zoo Yearbook**, v. 42, n. 1, p. 30-39, 2008.

PESSIER, A. P. An overview of amphibian skin disease. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 11, n. 3, p. 162-174, 2002.

PESSIER, A. P. Cytologic diagnosis of disease in amphibians. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 10, n. 1, p. 187-206, 2007.

PESSIER, A. P.; MENDELSON, J. R. **A Manual for control of infectious disease in amphibian survival assurance colonies and reintroduction programs**. San Diego: IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group: Apple Valley. Zoological

Society of San Diego, 2010. 229 p. Disponível em: http://www.cbsg.org/cbsg/workshopreports/26/amphibian_disease_manual.pdf. Acesso em: 10 jan. 2011.

PESSIER, A. P.; NICHOLS, D. K.; LONGCORE, J. E. ; FULLER, M. S. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frog (*Dendrobatis* spp.) and White's tree frog (*Litoria caerulea*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 2, p. 194-199, 1999.

PINHÃO, R.; WUNDERLICH, A. C.; ANJOS, L. A.; SILVA, R. J. Helminths of toad *Rhinella icterica* (Bufonidae) from the municipality of Botucatu, São Paulo State, Brazil. **Neotropical Helminthology**, v. 3, n. 1, p. 35-40, 2009.

PIOTROWSKI, J. S.; ANNIS, L. S.; LONGCORE, J. E. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. **Mycologia**, v. 96, n. 1, p. 9-15, 2004.

POYTON, S. L.; WHITAKER, B. R. Protozoa and metazoan infecting amphibians. In: WRIGHT, K.M.; WHITAKER, B.R. **Amphibian Medicine and Captive Husbandry**. Malabar: Krieger Publishing Company, 2001. p. 182-191.

PUSCHENDORF, R.; BALAÑOS, F. Detention of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Eleutherodactylus fitzingeri*: effects of skin sample location and histologic stain. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 301-306, 2006.

RACHOWICZ, L. J.; VREDENBURG, V. T. Transmission of *Batrachochytrium dendrobatidis* within and between amphibian life stages. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 61, n. 1-2, p. 75-83, 2004.

RAFFEL, T. R.; DILLARD, J. R.; BARRY, D. S. Field evidence of leech borned transmission of amphibian *Ichthyophonus* sp. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 6 , p. 1256-1264, 2006.

RAMAKRISHNAN, L.; VALDIVIA, R. H.; McKERROW, J. H.; FALKOW, S. *Mycobacterium marinum* causes both long term and subclinical infection and acute disease in leopard frogs (*Rana pipens*). **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 767-773, 1997.

REED, K. D.; RUTH, G. R.; MEYER, J. A.; SHUKLA, S. K. *Chlamydia pneumonia* infection in a breeding colony of African clawed frog (*Xenopus tropicalis*). **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 196-199, 2000.

RETALLICK, R. W.; MCCALLUM, R. H.; SPEARE, R. Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community post-decline. **Plos Biology**, v. 2, n. 11, 2004. Disponível em <http://www.plosbiology.org/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.0020351>>. Acesso em: 22 maio 2009.

RETALLICK, R. W. R.; MIERA, V. Strain differences in the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and non-permanent, sub-lethal effects of infection. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 75, n. 3, p. 201-207, 2007.

ROHR, J. R.; SCHOTTOEFER, A. M.; RAFFEL, T. R. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. **Nature**, v. 455, n. 7217, p. 1235-1239, 2008.

ROLLINS-SMITH, L. A.; CONTON, J. M. Antimicrobial peptide defense against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian populations. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, n. 7, p. 589-598, 2005.

RON, S. R. Predicting the distribution of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in the New World. **Biotropica**, v. 37, n. 2, p. 209-221, 2005.

RUIZ, A.; RUEDA-ALMONACID, J. V. *Batrachochytrium dendrobatidis* and chytridiomycosis in anuran amphibians of Colombia, **Ecohealth**, v. 5, n. 1, p. 27-33, 2008.

SANCHEZ-MORGADO, J. M.; GALLAGHER, A.; JOHNSON, L. K. *Mycobacterium gordonae* infection in a colony of African clawed frog (*Xenopus tropicalis*). **Laboratory Animals**, v. 43, n. 3, p. 300-303, 2009.

SANTOS, J. N.; GIESE, E. G.; MALDONADO JR., A.; LANFUDI, R. M. A new species of *Oswaldocruzia* (Molineidae: Nematoda) in *Chaunus marinus* (Amphibian: Bufonidae) (Linnaeus, 1758) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 264-268, 2008.

SANTOS, V. G. T.; AMATO, S. B. Helminth fauna of *Rhinella fernandezae* (Anura: Bufonidae) from the Rio Grande do Sul coastland, Brazil: analysis of the parasite community. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 823-826, 2010.

SBH. SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. **Lista oficial de espécies de anfíbios do Brasil**. 2009. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.thm>>. Acesso em: 13 out. 2010.

SCHANDER, C.; HALANYCH, K. M. DNA, PCR and formolized animal tissue – a short review and protocols. **Organisms Diversity and Evolution**, v. 3, p.195-205, 2003.

SCHLOEGEL, L. M.; FERREIRA, C. M.; JAMES, T. Y.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J. E.; HYATT, A. D.; YASBLEY, M.; MARTINS, A. M. R. P. F.; MAZZONI, R.; DAVIES, A. J.; DASZAK, P. The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. **Animal Conservation**, v. 13, n. 1, p. 53-61, 2010.

SCHLOEGEL, L. M.; PICCO, A.; KILPATRICK, A. M.; DAVIES, A. J.; HYATT, A. D.; DASZAK, P. Magnitude of the US trade in amphibians and presence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and ranavirus infection in imported North American bullfrog (*Rana catesbeiana*). **Biological Conservation**, v. 142, n. 7, p. 1420-1426, 2009.

SCHLOEGEL, L. M.; DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; SPEARE, R.; HILL, B. Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): an assessment. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 92, n. 2-3, p. 101-108, 2010.

SCHOTTHOEFER, A. M.; LABAK, K. M.; RAFFEL, T. R. *Ribeiroia ondatrae carcariae* are consumed by aquatic invertebrate predators. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 5, p. 1240-1243, 2007.

SEIXAS, F.; MARTINS, M. L.; PINTO, M. L.; TRAVASSOS, P. J.; MIRANDA, M.; PIRES, M. A. A case of pulmonary cryptococcosis in a free living toad (*Bufo bufo*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 2, p. 460-463, 2008.

SESSIONS, S. K.; RUTH, S. B. Explanation for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians. **Journal of Experimental Zoology**, v. 254, n. 1, p. 38-47, 1990.

SHEAFOR, B.; DAVIDSON, E. W.; PARR, L.; ROLLINS-SMITH. Antimicrobial peptide defenses in the salamander, *Amystoma trigrinum*, against emerging amphibian pathogens. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 2, p. 226-236, 2008.

SHUTLER, D.; SMITH, T. G.; ROBINSON, S. R. Relationships between leukocytes and *Hepatozoon* spp. In green frogs, *Rana clamitans*. **Journal of Wildlife Disease**, v. 45, n. 1, p. 67-72, 2009.

SILVANO, D. L.; SEGALLA, M. V. Conservation of Brazilian Amphibians. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 653-658, 2005.

SITJÀ-BOBADILLA, A. Can myxosporean parasites compromise fish and amphibian reproduction? **Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 276, n. 1669, p. 2861-2870, 2009.

SMALES, L. R. *Acanthocephala* in amphibians (Anura) and reptiles (Squamata) from Brazil and Paraguay with description of new species. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 392-398, 2007.

SMITH, T. G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 565-585, 1996.

SMITH, R. L.; SCHNACK, J. A.; SCHAEFER, E. F.; KEHR, A. I. Ticks, *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae), on toads, *Chaunus schneideri* and *Chaunus granulosus* (Anura: Bufonidae), in northern Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 560-562, 2008.

SPEARE, R.; BERGER, L. **Chytridiomycosis in amphibians in Australia**. James Cook University, Townsville, 2005. Disponível em: <<http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/chyspec.htm>>. Acesso em: maio 2011.

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783-1786, 2004.

SZEZEPANIAK, K.; TOMEZUK, K.; STUDZINSKI, A, M. Cutaneous myxosporidiasis in the Australian green tree frog (*Litoria caerulea*). **Parasitological Research**, v. 108, n. 2, p. 489-492, 2011.

AZUROCZI, P.; RICHARDSON, J. M. L. The role of trematodes in larval anuran communities: an aquatic ecologist's guide to the major players. **Oecologia**, v. 161, p. 371-385, 2009.

TAYLOR, S. K. Mycosis. In: WRIGHT, K. M.; WHITAKER, B. R. **Amphibian medicine and captive husbandry**. Malabar: Krieger Publishing Company, 2001. p. 182-191.

TAYLOR, S. K.; GREEN, D. E.; WRIGHT, K. M.; WHITAKER, B. R. Bacterial diseases. In: WRIGHT, K. M.; WHITAKER, B. R. **Amphibian medicine and captive husbandry**. Malabar: Krieger Publishing Company, 2001. p. 160-179.

TEMPLE, S. A. Do predators always capture sub standard disproportionately from prey populations? **Ecology**, v. 68, n. 3, p.669-674, 1987.

TOLEDO, L. F.; BRITTO, F. B.; ARAÚJO, O. G. S.; GIASSEN, L. M. O.; HADDAD, C. F. B. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* on Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. **South American Journal of Herpetology**, v. 3, p. 185-191, 2006a.

TOLEDO, L. F.; HADDAD, C. F. B.; CARNAVAL, A. C. O. Q.; BRITTO, F. B. A brazilian anura (*Hylodes magalhaesi*: Leptodactylidae) infected by *Batrachochytrium dendrobatidis*: a conservation concern. **Amphibian and Reptile Conservation**, v. 4, n. 1, p. 17-21, 2006b.

UNI, Y.; KADERAKU, S.; TAMUKAI, K.; GOKA, K.; KUROKI, T. First report of spontaneous chytridiomycosis in frogs in Asia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 82, n. 2, p. 157-160, 2008.

VAN SLUYS, M.; SCHITTINI, G. M.; MARRA, R. V.; AZEVEDO, A. R. M.; VICENTI, J. J.; VRCIBRADIC, D. Body size, diet and endoparasites of the microhylid frog *Chiasmocleis capixaba* in an Atlantic Forest area of Southern Bahia State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 1A, p. 167-173, 2006.

VELOTA, A. M. V.; ANJOS, L. A.; OTANI, L.; SILVA, R. J. **Helmintofauna associada ao anfíbio *Proceratophrys boiei* (Cycloramphidae) em fragmentos de mata atlântica no leste do Estado de São Paulo**. Botucatu, 2011. Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_32909960854>. Acesso em: 10 maio 2011.

VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C.; PINTO, R. M. Nematóides do Brasil 2ª. parte: nematóides de anfíbios. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 7, n. 4, p. 549-626, 1991.

VOYLES, J.; YOUNG, S.; BERGER, L.; CAMPBELL, C.; VOYLES, W. F.; DINUDOM, A.; COOK, D.; WEBB, R.; ALFORD, R. A.; SKERRAT, L. F.; SPEARE, R. Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian decline. **Science**, v. 326, n. 5952, p. 582-585, 2009.

WEBB, R.; MENDEZ, D.; BERGER, L.; SPEARE, R. Additional disinfectants effective against the amphibian chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 74, n. 1, p. 13-16, 2007

WEYGOLDT, P. Changes in composition of mountain stream frog communities in the Atlantic Mountains of Brazil: frogs as an indicators of environmental deteriorations? **Studies on Neotropical Fauna Environment**, v. 243, p. 249-255, 1989.

WELDON, C.; DU PREEZ, L. H.; HYATT, A. D.; MULLER, R.; SPEARE, R. Origen of the amphibian chytrid fungus. **Emerging Infectious Disease**, v. 10, n. 12, p. 2100-2105. 2004.

WELLS, K. D. Phylogeny, classification, and morphological evolution. In: WELLS, K. D. **The Ecology and behavior of amphibians**. Chicago: The University of Chicago Press, 2007. p. 1-81.

WIWANITKIT, W. A review of human spargonosis in Thailand. **International Journal of Infectious Disease**, v. 9, n. 6, p. 312-316, 2005.

WOODHAMS, D. C.; ALFORD, R. A.; MARANTELLI, G. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 55, n. 1, p. 65-67, 2003.

WRIGHT, K. M. Overview of amphibian medicine. In: MADER, D. R. **Reptile medicine and surgery**. 2. ed. St Louis: Saunders, 2006. p. 941-971.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum III. The nematodes of vertebrates**. New York: InterScience Publishier, 1961. 1261 p.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum I-V. The cestodes of vertebrates**. New York: InterScience Publishier, 1959. 860 p.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum I-II. The digenetic trematodes of vertebrates**. New York: InterScience Publishier, 1958. 1575 p.

APÊNDICE A - Distribuição dos resultados microbiológicos, parasitológicos e molecular para Bd em função da espécie e identificação individual, São Paulo 2009-2010

Identificação	Espécies	Microbiologia	Molecular	Parasitológico
BO 01	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 02	<i>Adenomera marmorata</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 03	<i>Ischnocnema parva</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 04	<i>Paratelmatobius cardosoi</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 05	<i>Dendropsophus microps</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 06	<i>Ischnocnema juipoca</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 07	<i>Dendropsophus microps</i>	Não coletado	Positivo	Negativo
BO 08	<i>Ischnocnema randorum</i>	Não coletado	Positivo	Negativo
BO 09	<i>Ischnocnema parva</i>	Não coletado	Positivo	Negativo
BO 10	<i>Ischnocnema parva</i>	Não coletado	Positivo	Negativo
BO 11	<i>Ischnocnema guentheri</i>	Não coletado	Positivo	Negativo
BO 12	<i>Scinax crospedophilus</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 13	<i>Scinax crospedophilus</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 14	<i>Aplastodiscus arildae</i>	Não coletado	Positivo	Negativo

Identificação	Espécies	Microbiologia	Molecular	Parasitológico
BO 15	<i>Hypsiboas faber</i>	Não coletado	Positivo	
BO 16	<i>Hypsiboas faber</i>	Não coletado	Positivo	<i>Oxyascaris</i> sp
BO 17	<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	Não coletado	Positivo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 18	<i>Aplastodiscus arildae</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 19	<i>Scinax crospodosfilus</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 20	<i>Bokermannohyla astartea</i>	Não coletado	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp
BO 21	<i>Hypsiboas faber</i>	Não coletado	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 22	<i>Hylodes asper</i>	Não coletado	Positivo	Não identificado
BO 23	<i>Hylodes asper</i>	Não coletado	Positivo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 24	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Não coletado	Positivo	<i>Oxyascaris</i> sp
BO 25	<i>Bokermannohyla astartea</i>	Não coletado	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp. Plerocercóide
BO 26	<i>Bokermannohyla astartea</i>	Não coletado	Negativo	Não identificado
BO 27	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 28	<i>Bokermannohyla astartea</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 29	<i>Bokermannohyla circumdata</i>	Não coletado	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 30	<i>Aplastodiscus arildae</i>	Não coletado	Negativo	Não identificado

Identificação	Espécies	Microbiologia	Molecular	Parasitológico
BO 31	<i>Aplatodiscus albosignatus</i>	Não coletado	Negativo	<i>Aplectana</i> sp.
BO 32	<i>Scinax crospedophilus</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 33	<i>Dendropsophus microps</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 34	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Não coletado	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp
BO 35	<i>Bokermannohyla astartea</i>	Não coletado	Positivo	Negativo
BO 36	<i>Hypsiboas pardalis</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 37	<i>Bokermannohyla astartea</i>	Não coletado	Positivo	Não identificado
BO 38	<i>Hypsiboas pardalis</i>	Não coletado	Positivo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 39	<i>Hadaddus binotatus</i>	Não coletado	Positivo	Pleroceroide
BO 40	<i>Hypsiboas albomarginatus</i>	Não coletado	Positivo	Pleroceroide, <i>Aplectana</i> sp.
BO 41	<i>Hypsiboas pardalis</i>	Não coletado	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 42	<i>B. hylax</i>	Não coletado	Não coletado	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 43	<i>Rhinella</i>	Não coletado	Não coletado	Negativo
BO 44	<i>Scinax crospedophilus</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 45	<i>Hylodes asper</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 46	<i>Hylodes asper</i>	Contaminação	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp. <i>Strongyloides</i> sp.

Identificação	Espécies	Microbiologia	Molecular	Parasitológico
BO 47	<i>Hylodes asper</i>	Contaminação	Negativo	<i>Aplectana</i> sp.
BO 48	<i>Hylodes asper</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 49	<i>Hylodes asper</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 50	<i>Hylodes phyllodes</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 51	<i>Leptodactylus latrans</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 52	<i>Leptodactylus latrans</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 53	<i>Leptodactylus latrans</i>	Contaminação	Negativo	Pleroceroide <i>Aplectana</i> sp., <i>Ptero.</i>
BO 54	<i>Leptodactylus latrans</i>	Não coletado	Negativo	Pleroceroide
BO 55	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Não coletado	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 56	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 57	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Não coletado	Negativo	Não identificado
BO 58	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 59	<i>Ischnocnema guentheri</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 60	<i>Scinax alter</i>	Contaminação	Positivo	Negativo
BO 61	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Contaminação	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 62	<i>Scinax hayii</i>	Contaminação	Negativo	Não identificado

Identificação	Espécies	Microbiologia	Molecular	Parasitológico
BO 63	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 64	<i>Scinax hayii</i>	Contaminação	Negativo	Em identificação
BO 65	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 66	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 67A	<i>Ischnocnema juipoca</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 67B	<i>Ischnocnema juipoca</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 68	<i>Ischnocnema juipoca</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 69	<i>Scinax hayii</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 70	<i>Adenomera marmorata</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 71	<i>Dendropsophus minutus</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 72	<i>Scinax alter</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 73	<i>Dendropsophus minutus</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 74	<i>Scinax alter</i>	Contaminação	Positivo	Negativo
BO 75	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 76	<i>Scinax alter</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 77	<i>Scinax alter</i>	Contaminação	Negativo	Negativo

Identificação	Espécies	Microbiologia	Molecular	Parasitológico
BO 78	<i>Scinax alter</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 79	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Contaminação	Negativo	Não identificado
BO 80	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Contaminação	Negativo	<i>Aplectana</i> sp.
BO 81	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 82	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Contaminação	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 83	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 84	<i>Haddadus binotatus</i>	Contaminação	Negativo	<i>Aplectana</i> sp.
BO 85	<i>Hypsiboas faber</i>	Contaminação	Não coletado	Em identificação
BO 86	<i>Rhinella icterica</i>	Contaminação	Não coletado	<i>Oxyascaris</i> sp. <i>Aplectana</i> sp.
BO 87	<i>Hypsiboas faber</i>	Contaminação	Não coletado	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 88	<i>Scinax brieni</i>	Negativo	Negativo	<i>Aplectana</i> sp.
BO 89	<i>Hylodes phyllodes</i>	Contaminação	Positivo	Negativo
BO 90	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Contaminação	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 91	<i>Ischnonecnema guentheri</i>	Contaminação	Negativo	<i>Aplectana</i> sp.
BO 92	<i>Bokermanoyla hylax</i>	Negativo	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 93	<i>B. circundata</i>	Negativo	Positivo	<i>Oxyascaris</i> sp.

Identificação	Espécies	Microbiologia	Molecular	Parasitológico
BO 94	<i>Hypsiboas polytaeniatus</i>	Negativo	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 95	<i>Hypsiboas polytaeniatus</i>	Contaminação	Negativo	Negativo
BO 96	<i>Scinax brieni</i>	Contaminação	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 97	<i>Scinax brieni</i>	Negativo	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp. <i>Aplectana</i> sp.
BO 98	<i>Scinax brieni</i>	Negativo	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 99	<i>Dendropsophus minutus</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 100	<i>Dendropsophus minutus</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 101	<i>Dendropsophus minutus</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 102	<i>Dendropsophus minutus</i>	Não coletado	Positivo	Negativo
BO 103	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 104	<i>Scinax</i> sp.	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 105	<i>Scinax</i> sp.	Não coletado	Negativo	Negativo
BO 106	<i>Scinax</i> sp.	Negativo	Negativo	Negativo
BO 107	<i>Dendropsophus microps</i>	Negativo	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 108	<i>Dendropsophus microps</i>	Negativo	Negativo	<i>Cosmocerca</i> sp.
BO 109	<i>Dendropsophus microps</i>	Negativo	Negativo	Não identificado

Identificação	Espécies	Microbiologia	Molecular	Parasitológico
BO 110	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Negativo	Negativo	<i>Oxyascaris</i> sp.
BO 111	<i>Phyllodes hylodes</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 112	<i>Scinax hayii</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 113	<i>Scinax hayii</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 114	<i>Scinax hayii</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 115	<i>Scinax hayii</i>	Negativo	Negativo	Negativo
BO 116	<i>Scinax hayii</i>	Negativo	Negativo	Não identificado
BO 117	<i>Rhinella ornata</i>	Negativo	Negativo	Não identificado <i>Oswaldocruzia</i> sp.
BO 118	<i>Rhinella ornata</i>	Negativo	Negativo	<i>Cosmocerca</i> sp. <i>Oswaldocruzia</i> sp.
BO 119	<i>Rhinella ornata</i>	Negativo	Negativo	<i>Cosmocerca</i> sp. <i>Rhabdias</i> sp.

APÊNDICE B - Distribuição dos resultados histopatológico em função das espécies e da identificação individual. São Paulo 2009-2010

Identificação	Espécies	Histopatológico
BO 01	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Intestino grosso, parasitas
BO 02	<i>Adenomera marmorata</i>	Pele, dermatite granulocítica difusa discreta
BO 03	<i>Ischnocnema parva</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 04	<i>Paratelmatobius cardosoi</i>	Fígado, acúmulo de glicogênio; Intestino grosso, protozoários ciliados
BO 05	<i>Dendropsophus microps</i>	Traquéia, parasita encistado em serosa/celomite parasitária discreta; Fígado, proliferação de melanomacrófagos; Baço, hiperplasia linfóide discreta
BO 06	<i>Ischnocnema juipoca</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 07	<i>Dendropsophus microps</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 08	<i>Ischnocnema randorum</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 09	<i>Ischnocnema parva</i>	Estruturas compatíveis com Bd; hiperqueratose da pele
BO 10	<i>Ischnocnema parva</i>	Nematóide em intestino grosso com estruturas compatíveis com <i>Oxyascaris</i> sp.
BO 11	<i>Ischnocnema guentheri</i>	Estruturas compatíveis com Bd; hiperqueratose e hiperplasia da pele; dermatite focal; nematóide em intestino grosso com estruturas compatíveis com <i>Oxyascaris</i> sp.
BO 12	<i>Scinax crospedophilus</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 13	<i>Scinax crospedophilus</i>	Pele, hiperqueratose discreta; Pele, dermatite mononuclear multifocal discreta.
BO 14	<i>Aplastodiscus arildae</i>	Intestino grosso, parasita
BO 15	<i>Hypsiboas faber</i>	Pele, hiperqueratose discreta; Rim, granuloma parasitário com estruturas compatíveis a um trematóide
BO 16	<i>Hypsiboas faber</i>	Intestino delgado; nematóide; Intestino grosso; parasitas com estruturas compatíveis com <i>Oxyascaris</i> sp.; Vesícula urinária, granuloma parasitário com estruturas compatíveis com <i>Acanthocephala</i> sp.; Vesícula urinária. Discreta citite granulocítica; Coração, epicardite crônica discreta; Pele, hiperplasia e hiperqueratose discreta
BO 17	<i>Aplastodiscus leucopygius</i>	Fígado, hepatite mononuclear focal discreta
BO 18	<i>Aplastodiscus arildae</i>	Fígado, hepatite granulomatosa multifocal discreta
BO 19	<i>Scinax crospedophilus</i>	Fígado e baço, hematopoiese extramedular; Pulmão, pneumonia discreta;

Identificação	Espécies	Histopatológico
BO 20	<i>Bokermannohyla astartea</i>	Fígado, hepatite mononuclear multifocal discreta; Vesícula biliar, myxozoário
BO 21	<i>Hypsiboas faber</i>	Pele, dermatite granulocítica multifocal discreta; Estômago, granuloma parasitário com presença de eosinófilos na submucosa
BO 22	<i>Hylodes asper</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 23	<i>Hylodes asper</i>	Não realizado
BO 24	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Estômago, granuloma parasitário com estruturas compatíveis com <i>Acanthocephalo</i> sp.
BO 25	<i>Bokermannohyla astartea</i>	Fígado, hepatite granulocítica difusa; baço, hiperplasia linfóide; Bexiga, espermatozoides; Pulmão, pneumonia intersticial; Estômago, gastrite parasitária
BO 26	<i>Bokermannohyla astartea</i>	
BO 27	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Pele, hiperqueratose; pele, dermatite multifocal discreta; Vesícula biliar, myxozoário
BO 28	<i>Bokermannohyla astartea</i>	Não realizado
BO 29	<i>Bokermannohyla circundata</i>	Pele, dermatite aguda erosiva discreta; Fígado, hepatite granulomatosa multifocal discreta; Pulmão, estruturas compatíveis com estágios larvais de nematóide: intestino delgado, enterite parasitária discreta
BO 30	<i>Aplastodiscus aridae</i>	Fígado, granuloma parasitário; Fígado, hepatite granulomatosa multifocal; Pulmão, pneumonia discreta
BO 31	<i>Aplastodiscus albosignatus</i>	Não realizado
BO 32	<i>Scinax crospedophilus</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 33	<i>Dendropsophus microps</i>	Não realizado
BO 34	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 35	<i>Bokermannohyla astartea</i>	Fígado, hepatite crônica discreta; Fígado, proliferação de melanomacrófagos
BO 36	<i>Hypsiboas pardalis</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 37	<i>Bokermannohyla astartea</i>	Pele, hiperplasia e hiperqueratose discreta; Pele, dermatite granulocítica focal discreta; Rim, nefrite intersticial multifocal discreta; Vesícula biliar, trematóide degenerado
BO 38	<i>Hypsiboas pardalis</i>	Pele, hiperplasia e hiperqueratose moderada; Pele, estruturas compatíveis com Bd; Rim, dilatação de túbulos; Gordura, atrofia;
BO 39	<i>Hadaddus binotatus</i>	Estômago, parasita na mucosa; Intestino grosso, ovos de parasitas
BO 40	<i>Hypsiboas albomarginatus</i>	Não realizado

Identificação	Espécies	Histopatológico
BO 41	<i>Hypsiboas pardalis</i>	Pele, hiperplasia e hiperqueratose moderada; Gordura, atrofia discreta; Coração, epicardite crônica discreta
BO 42	<i>B. hylax</i>	Pele, dermatite multifocal crônica; Intestino grosso, nematóides; Rim, myxozoários; Baço, hematopoiese extramedular
BO 43	<i>Rhinella</i>	Fígado, hepatite crônica multifocal discreta; Rim, nefrite crônica intersticial; Baço, hiperplasia linfóide discreta; Intestino, protozoários ciliados, opanilídeos e nematóide
BO 44	<i>Scinax crospedophilus</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 45	<i>Hylodes asper</i>	Autólise
BO 46	<i>Hylodes asper</i>	Autólise
BO 47	<i>Hylodes asper</i>	Pele, dermatite crônica multifocal discreta; Rim, hematopoiese extramedulas; Baço, hiperplasia linfóide discreta.
BO 48	<i>Hylodes asper</i>	Pele, dermatite crônica focal discreta; Pele, hiperqueratose; Baço, hiperplasia linfática discreta
BO 49	<i>Hylodes asper</i>	Pele, dermatite focal discreta; Baço, hiperplasia linfóide discreta; fígado, hepatite focal discreta; fígado, proliferação de melanomacrófagos
BO 50	<i>Hylodes phyllodes</i>	Pele, dermatite crônica focal discreta; Estômago, granulomas parasitários de nematóide em submucosa com estruturas compatíveis com ascarídeo; Baço, discreta hiperplasia linfóide
BO 51	<i>Leptodactylus latrans</i>	Pele, hiperqueratose discreta; Rim, nefrite intersticial crônica discreta; Fígado, hepatite crônica discreta
BO 52	<i>Leptodactylus latrans</i>	Pele, hiperqueratose discreta; Intestino, protozoários ciliados
BO 53	<i>Leptodactylus latrans</i>	Fígado, protozoários nos sinusóides ou células endoteliais e pequenos granulomas parasitários com estruturas compatíveis com protozoário; Intestino delgado, protozoários ciliados; Estômago, gastrite focal discreta
BO 54	<i>Leptodactylus latrans</i>	Baço, discreta hiperplasia linfóide
BO 55	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 56	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Fígado, proliferação de melanomacrófagos; Baço, hematopoiese extramedular discreta; Gordura, atrofia
BO 57	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Fígado, hiperplasia de melanomacrófagos; Rim, granuloma parasitário com estruturas compatíveis com trematóide; Gonodas, testículos e ovários

Identificação	Espécies	Histopatológico
BO 58	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Pele e vasos linfáticos, Perilinfagite granulocítica moderada; Intestino grosso, nematóides; Vesícula biliar, myxozoários; Língua, granuloma inflamatório focal discreto; Rim, granuloma parasitário com estruturas compatíveis com trematóide; Fígado, proliferação de melanomacrófagos
BO 59	<i>Ischnocnema guentheri</i>	Autólise
BO 60	<i>Scinax alter</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 61	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Fígado, proliferação de melanomacrófagos; Gordura, atrofia; Intestino grosso, nematóide
BO 62	<i>Scinax hayii</i>	Intestino delgado, opanilideos e protozoários ciliados; Vesícula biliar, myxozoários; Rim, granuloma parasitário com estruturas compatíveis com trematóide
BO 63	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Coração, epicardite crônica discreta
BO 64	<i>Scinax hayii</i>	Pele, dermatite multifocal crônica discreta; Bexiga, granuloma; Coração, epicardite crônica discreta; Baço, hematopoiese extramedular; Língua, glossite multifocal discreta
BO 65	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Gordura, atrofia; Baço, hematopoiese extramedular; Cavidade celomática, granuloma parasitário
BO 66	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 67 ^a	<i>Ischnocnema juipoca</i>	Pele, discreta hiperqueratose
BO 67B	<i>Ischnocnema juipoca</i>	Fígado, acúmulo de glicogênio
BO 68	<i>Ischnocnema juipoca</i>	Fígado, acúmulo de glicogênio
BO 69	<i>Scinax hayii</i>	Fígado, proliferação de melanomacrófagos; Rim, granulomas parasitários com estruturas compatíveis com trematóide
BO 70	<i>Adenomera marmorata</i>	Pele, hiperqueratose e dermatite multifocal crônica discreta
BO 71	<i>Dendropsophus minutus</i>	Vesícula biliar, myxozoário
BO 72	<i>Scinax alter</i>	Vesícula biliar, myxozoário; Gordura, atrofia
BO 73	<i>Dendropsophus minutus</i>	Intestino grosso, protozoários ciliados; Rim, nefrite intersticial crônica discreta
BO 74	<i>Scinax alter</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 75	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Intestino grosso; strongyloides na mucosa
BO 76	<i>Scinax alter</i>	Pele, dermatite crônica multifocal discreta; Gordura, atrofia; Intestino grosso, protozoários ciliados e nematóides; Pulmão, parasita

Identificação	Espécies	Histopatológico
BO 77	<i>Scinax alter</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 78	<i>Scinax alter</i>	Intestino grosso, protozoários ciliados
BO 79	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Baço, hematopoiese extra medular; Intestino grosso, nematóides
BO 80	<i>Hypsiboas bischoffi</i>	Vesícula biliar, myxozoário; Gordura, atrofia; Rim, hematopoiese extra medular
BO 81	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Intestino grosso, nematóide com estruturas compatíveis com <i>Oxyascaris</i> sp, protozoários ciliados e opanilídeos
BO 82	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 83	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Fígado,proliferação de melanomacrófagos; Intestino delgado, protozoário ciliado
BO 84	<i>Haddadus binotatus</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 85	<i>Hypsiboas faber</i>	Estômago, nematóide na parede estomacal
BO 86	<i>Rhinella icterica</i>	Autólise
BO 87	<i>Hypsiboas faber</i>	Dentro dos limites da normalidade; parcialmente autolisado
BO 88	<i>Scinax brien</i>	Intestino, nematóide; parcialmente autolisado
BO 89	<i>Hylodes phyllodes</i>	Pele, hiperqueratose discreta; Vesícula biliar, myxozoário
BO 90	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Fígado, depósito glicogênio; Fígado, hepatite crônica focal discreta; Fígado, proliferação de melanomacrófagos
BO 91	<i>Ischnonecema guentheri</i>	Fígado, acúmulo de glicogênio
BO 92	<i>Bokermanoyla hylax</i>	Pulmão; <i>Rabdias</i> sp.
BO 93	<i>B circundata</i>	Pele, dematite crônica focal discreta
BO 94	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Fígado, proliferação de melanomacrófagos
BO 95	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Dentro dos limites da normalidade
BO 96	<i>Scinax brien</i>	Vesícula biliar, myxozoário; Fígado, hepatite crônica focal discreta; Intestino, nematóide
BO 97	<i>Scinax brien</i>	Intestino delgado, nematóide
BO 98	<i>Scinax brien</i>	Pele, dermatite multifocal; Intestino grosso, protozoário ciliado
BO 99	<i>Dendropsophus minutus</i>	Fígado, proliferação de melanomacrófagos
BO 100	<i>Dendropsophus minutus</i>	Fígado, proliferação de melanomacrófagos
BO 101	<i>Dendropsophus minutus</i>	Vesícula biliar, myxozoário; Rim, myxozoário; Intestino grosso, protozoários ciliados
BO 102	<i>Dendropsophus minutus</i>	Intestino delgado, nematóides
BO 103	<i>Physalaemus cuvieri</i>	Gordura, atrofia discreta

Identificação	Espécies	Histopatológico
BO 104	<i>Scinax sp.</i>	Dentro dos Limites da Normalidade
BO 105	<i>Scinax sp.</i>	Dentro dos Limites da Normalidade
BO 106	<i>Scinax sp.</i>	Dentro dos Limites da Normalidade
BO 107	<i>Dendropsophus microps</i>	Intestino delgado, protozoário ciliado e larvas de nematóide
BO 108	<i>Dendropsophus microps</i>	Dentro dos Limites da Normalidade
BO 109	<i>Dendropsophus microps</i>	Vesícula biliar, myxozoário; Intestino delgado, parasita
BO 110	<i>Hypsiboas polytaenius</i>	Dentro dos Limites da Normalidade
BO 111	<i>Phyllodes hylodes</i>	Estômago, cisto parasitário em serosa; Intestino delgado, protozoário flagelado; Gordura, atrofia
BO 112	<i>Scinax hayii</i>	Pele, dermatite crônica focal discreta; Baço, hiperplasia linfóide
BO 113	<i>Scinax hayii</i>	Rim, hematopoiese extra medular
BO 114	<i>Scinax hayii</i>	Fígado, congestão moderada; Pulmão. Congestão moderada; Rim, congestão moderada
BO 115	<i>Scinax hayii</i>	Fígado, congestão moderada; Pulmão. Congestão moderada; Rim, congestão moderada
BO 116	<i>Scinax hayii</i>	Fígado, congestão moderada; Pulmão. Congestão moderada; Rim, congestão moderada; Rim, hematopoiese extra medular; Cavidade celomática, granuloma parasitário
BO 117	<i>Rhinella ornata</i>	Baço, hiperplasia linfóide; Fígado, hepatite crônica focal discreta; Rim, espermatozoides em glomérulos
BO 118	<i>Rhinella ornata</i>	Rim, hematopoiese extra medular; Rim, espermatozoides em glomérulos
BO 119	<i>Rhinella ornata</i>	Cavidade celomática, Acanthocephala; Pele, adenite de glândula serosa; Musculatura; Acanthocephala

ANEXO A - Distribuição dos parasitas já identificados em anfíbios em função dos locais onde foram encontrados

Ocorrência											
	Pele	Guelras	Pulmões	Trato digestório	Gonodas	Órgãos	Bexiga	Vesícula biliar	Sangue	Músculo	Cavidade celomática
Protozoários											
Ciliados	+	+		+			+				
Opanilídeos				+							
Flagelados	+	+		+		+			+		
Amebídeos				+		+					
Apicomplexa				+		+		+	+		
Microsporídia					+					+	
Metazoários											
Myxosporídia					+	+	+	+		+	+
Monogeanos	+	+		+			+				
Digeans	+	+	+	+		+	+				
Cestóides	+			+		+				+	+
Nematóides	+		+	+					+	+	+
Acanthocephala				+		+					+
Sanguessugas	+	+									
Crustáceos	+	+									

ANEXO B - Distribuição dos parasitas já identificados no Brasil em função da espécie, local encontrado no animal, prevalência, número total de animais e referências bibliográficas

Tipo	Parasita	Espécies	Localização	Prevalência (%)	Número de animais	Local	Referências
Nematoda	Acuariidae	<i>Scinax fuscomarginatus</i>	Estômago	8	12	PA	Goldenberg et al, 2007
Nematoda	Aplectana	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Intestino	5,71	70	DF	Holmes et al, 2005
Nematoda	<i>Aplectana sp.</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Intestino grosso	18,7	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	<i>Aplectana diluae</i>	<i>Proceratophrys appendiculata</i>	Estômago e intestino	76,5	17	RJ	Boquipana-Freitas et al, 2008
Nematoda	<i>Aplectana membranosa</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	Intestino delgado e grosso	73,3	17	RS	Santos & Amato, 2010
Nematoda	<i>Aplectana membranosa</i>	<i>Bufo marinus</i>	Intestino grosso			AM	Gonçalves et al, 2002
Nematoda	<i>Aplectana membranosa</i>	<i>Bufo granulosus</i>	Intestino grosso			AM	Gonçalves et al, 2002
Nematoda	<i>Aplectana membranosa</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Intestino grosso	37,5	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	<i>Brevemulticaecum sp</i>	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Cisto parede do trato gastrointestinal	42	31	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Brevemulticaecum sp</i>	<i>Leptodactylus pustulatus</i>	Cisto parede do trato gastrointestinal	16	19	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Capillaria sp.</i>	<i>Bufo marinus</i>	Intestino grosso			AM	Gonçalves et al, 2002
Nematoda	<i>Capillaria recondita</i>	<i>Leptodactylus rhodomystax</i>	Intestino delgado	20	5	PA	Goldenberg et al, 2007
Nematoda	<i>Cosmocerca brasiliense</i>	<i>Dendropsophus cachimbo</i>	Intestino grosso	10	10	PA	Goldenberg et al, 2007
Nematoda	<i>Cosmocerca brasiliense</i>	<i>Proceratophrys appendiculata</i>	Intestino	29,4	17	RJ	Boquipana-Freitas et al, 2008
Nematoda	<i>Cosmocerca parva</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	Intestino delgado e grosso	40	17	RS	Santos & Amato, 2010

Tipo	Parasita	Espécies	Localização	Prevalência (%)	Número de animais	Local	Referências
Nematoda	<i>Cosmocerca podicipinus</i>	<i>Leptodactylus fuscus</i>	Intestino	27	15	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Cosmocerca podicipinus</i>	<i>Leptodactylus leptodactyloides</i>	Intestino	78	9	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Cosmocerca podicipinus</i>	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Intestino	23	31	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Cosmocerca podicipinus</i>	<i>Leptodactylus petersii</i>	Intestino	52	31	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Cosmocerca podicipinus</i>	<i>Leptodactylus pustulatus</i>	Intestino	5	19	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Cosmocerca podicipinus</i>	<i>Scinax fuscomarginatus</i>	Intestino grosso	8	12	PA	Goldenberg et al, 2007
Nematoda	<i>Cosmocerca podicipinus</i>	<i>Pseudis pletensis</i>	Intestino grosso	3,1	32	MS	Camпиão et al, 2010
Nematoda	<i>Cosmocerca ornata</i>	<i>Chiasmocleis capixaba</i>	Intestino	66,4	119	BA	Van Sluys et al, 2006
Nematoda	<i>Cosmocerca sp.</i>	<i>Proceratophrys boiei</i>	Intestino grosso	17	17	SP	
Nematoda	<i>Cosmocerca sp.</i>	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Intestino	5,71	70	DF	Holmes et al, 2005
Nematoda	<i>Cosmocerca sp.</i>	<i>Bufo thyphonius</i>	Intestino grosso			AM	Gonçalves et al, 2002
Nematoda	<i>Cosmocercidae</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Intestino grosso	80	15	SP	Pinhão et al, 2009
Nematoda	<i>Falcaustra mascula</i>	<i>Leptodactylus rhodomystax</i>	Intestino delgado	60	5	PA	Goldenberg et al, 2007
Nematoda	<i>Falcaustra mascula</i>	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Intestino	1,42	70	DF	Holmes et al, 2005
Nematoda	<i>Falcaustra mascula</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Intestino delgado	15,6	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	<i>Ochoterenella scalaris</i>	<i>Leptodactylus pustulatus</i>	cavidade celomática	5	19	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Oewaldocruzia sp.</i>	<i>Proceratophrys boiei</i>	Intestino delgado e estômago	82 e 6 respec.		SP	
Nematoda	<i>Oswaldocruzia sp.</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	Intestino delgado	2,2	17	RS	Santos & Amato, 2010

Tipo	Parasita	Espécies	Localização	Prevalência (%)	Número de animais	Local	Referências
Nematoda	Oswaldocruzia sp.	Rhinella icterica	Intestino delgado	15,6	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	Oswaldocruzia sp.	Bufo marinus	Intestino grosso			AM	Gonçalves et al, 2002
Nematoda	Oswaldocruzia sp.	Hyla boans	Intestino grosso			AM	Gonçalves et al, 2002
Nematoda	Oswaldocruzia lapesi	Bufo marinus	Intestino grosso			AM	Gonçalves et al, 2002
Nematoda	Oswaldocruzia lapesi	Rhinella icterica	Intestino delgado	47	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	Oswaldocruzia mazzai	Bufo marinus	Intestino grosso			AM	Gonçalves et al, 2002
Nematoda	Oswaldocruzia mazzai	Rhinella icterica	Intestino delgado	6	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	Oswaldocruzia aubauricularis	Rhinella icterica	Intestino delgado	12,5	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	Oswaldocruzia belensis	Chaunus	Intestino delgado	100	5	PA	Santos et al, 2008
Nematoda	Oswaldocruzia proencai	Leptodactylus fuscus	Trato gastrointestinal	7	15	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	Oswaldocruzia proencai	Leptodactylus ocellatus	Trato gastrointestinal	16	31	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	Oswaldocruzia proencai	Leptodactylus pustulatus	Trato gastrointestinal	11	19	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	Oswaldocruzia subauriculares	Rhinella icterica	Intestino delgado e intestino grosso	73,3	15	SP	Pinhão et al, 2009
Nematoda	Oswaldocruzia voucheri	Leptodactylus fuscus	Intestino delgado	8	12	PA	Goldenberg et al, 2007
Nematoda	Oxyascaris sp.	Rhinella icterica	Intestino grosso	3	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	Parapharyngodon alvarengai	Rhinella icterica	Intestino grosso	3	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	Physaloptera retusa	Bufo granulosus	Estômago			AM	Gonçalves et al, 2002
Nematoda	Physaloptera retusa	Bufo thyphoni	Estômago			AM	Gonçalves et al, 2002

Tipo	Parasita	Espécies	Localização	Prevalência (%)	Número de animais	Local	Referências
Nematoda	<i>Physaloptera</i> sp.	<i>Bufo marinus</i>	Intestino			AM	Gonçalves et al, 2002
Nematoda	<i>Physaloptera</i> sp.	<i>Leptodactylus leptodactyloides</i>	Estômago	44	9	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Physaloptera</i> sp.	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Estômago	48	31	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Physaloptera</i> sp.	<i>Leptodactylus petersii</i>	Estômago	23	31	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Physaloptera</i> sp.	<i>Proceratophrys appendiculata</i>	Estômago	5,9	17	RJ	Boquipana-Freitas et al, 2008
Nematoda	<i>Physalopteridae</i> larvae	<i>Rhinella icterica</i>	Estômago	6,7	15	SP	Pinhão et al, 2009
Nematoda	<i>Rhabdias</i> sp.	<i>Pseudis pletensis</i>	Pulmão	3,1	32	MS	Camпиão et al, 2010
Nematoda	<i>Rhabdias</i> sp.	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Pulmão	8,57	70	DF	Holmes et al, 2005
Nematoda	<i>Rhantias</i> sp.	<i>Proceratophrys boiei</i>	Pulmão	64	17	SP	
Nematoda	<i>Rhabdias elegans</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Pulmão	3	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	<i>Rhabdias fueleborni</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	Pulmão	24,4	17	RS	Santos & Amato, 2010
Nematoda	<i>Rhabdias fueleborni</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Pulmão	53,1	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	<i>Rhabdias fueleborni</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Pulmão	80	15	SP	Pinhão et al, 2009
Nematoda	<i>Rhabdias sphaerocephala</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Pulmão	3	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	<i>Schrankiana formulosa</i>	<i>Leptodactylus fuscus</i>	Intestino grosso	67	12	PA	Goldenberg et al, 2007
Nematoda	<i>Schrankiana freitase</i>	<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Intestino grosso	100	1	PA	Goldenberg et al, 2007
Nematoda	<i>Schrankiana fuscus</i>	<i>Leptodactylus fuscus</i>	Intestino grosso	75	12	PA	Goldenberg et al, 2007
Nematoda	<i>Schrankiana schranki</i>	<i>Leptodactylus rhodomystax</i>	Intestino grosso	40	5	PA	Goldenberg et al, 2007
Nematoda	<i>Schrankiana larvata</i>	<i>Leptodactylus fuscus</i>	Intestino grosso	13	15	TO	Goldenberg et al, 2009

Tipo	Parasita	Espécies	Localização	Prevalência (%)	Número de animais	Local	Referências
Nematoda	Schrankiana larvata	<i>Leptodactylus mystaceus</i>	Intestino grosso	50	2	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	Schrankiana larvata	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Intestino grosso	16	31	TO	Goldenberg et al, 2009
Nematoda	<i>Sculzia travassosi</i>	<i>Proceratophrys appendiculata</i>	Pulmão e vesícula biliar	17,6	17	RJ	Boquipana-Freitas et al, 2008
Nematoda	<i>Strongyloides sp.</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Intestino delgado	3	32	RJ	Luque et al, 2005
Nematoda	<i>Strongyloides carinii</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	Intestino delgado	22,2	17	RS	Santos & Amato, 2010
Nematoda	Nematóide encistado	<i>Pseudis pletensis</i>	Cavidade celomática, serosa digestório	6,3	32	MS	Campião et al, 2010
Nematoda	Não identificado	<i>Hypsiboas albopunctatus</i>	Intestino	1,42	70	DF	Holmes et al, 2005
Trematoda	<i>Brachycoelium salamandrae</i>	<i>Leptodactylus rhodomystax</i>	Intestino delgado	20	5	PA	Goldenberg et al, 2007
Trematoda	<i>Brachycoelium salamandrae</i>	<i>Leptodactylus martinezi</i>	Intestino delgado	100	3	PA	Goldenberg et al, 2007
Trematoda	<i>Catadiscus sp.</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	Intestino grosso	1,1	17	RS	Santos & Amato, 2010
Trematoda	<i>Catadiscus sp.</i>	<i>Pseudis pletensis</i>	Intestino grosso	84,4	32	MS	Campião et al, 2010
Digenea	<i>Catadiscus marinholutzi</i>	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Intestino grosso	3	31	TO	Goldenberg et al, 2009
Trematoda	<i>Glypthelminis palmipedes</i>	<i>Pseudis pletensis</i>	Intestino delgado	65,6	32	MS	Campião et al, 2010
Trematoda	<i>Gorgoderina sp.</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	Bexiga	1,1	17	RS	Santos & Amato, 2010
Trematoda	<i>Gorgoderina festoni</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	Bexiga	1,1	17	RS	Santos & Amato, 2010

Tipo	Parasita	Espécies	Localização	Prevalência (%)	Número de animais	Local	Referências
Trematoda	Metacercaridae	<i>Rhinella fernandezae</i>	Rim	3,3	17	RS	Santos & Amato, 2010
Trematoda	<i>Metacercaria</i> sp.1	<i>Pseudis pletensis</i>	Córtex renal	34,4	32	MS	Camplão <i>et al</i> , 2010
Trematoda	<i>Metacercaria</i> sp.2	<i>Pseudis pletensis</i>	Cav. Cel. e musculatura pata traseira	25	32	MS	Camplão <i>et al</i> , 2010
Cestoda	<i>Cylindrotaenia americana</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	Intestino delgado	38	17	RS	Santos & Amato, 2010
Cestoda	<i>Pterocercoides</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	Cavidade celomática	2	17	RS	Santos & Amato, 2010
Cestoda	Não identificado	<i>Proceratophrys appendiculata</i>	Intestino delgado	11,8	17	RJ	Boquipana-Freitas <i>et al</i> , 2008
Acanthocephala	<i>Acanthocephalus lutzi</i>	<i>Rhinella fernandezae</i>	Intestino delgado	1,1	17	RS	Santos & Amato, 2010
Acanthocephala	<i>Acanthocephalus saopaulensis</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Intestino	33,3		SP	Smales, 2007
Acanthocephala	<i>Acanthocephalus saopaulensis</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Intestino delgado e intestino grosso	86,7	15	SP	Pinhão <i>et al</i> , 2009
Acanthocephala	<i>Centrorhynchus</i> sp.	<i>Rhinella fernandezae</i>	Cavidade celomática	84	17	RS	Santos & Amato, 2010
Acanthocephala	<i>Cystacanth</i> sp.	<i>Leptodactylus leptodactyloides</i>	Cavidade celomática	11	9	TO	Goldenberg <i>et al</i> , 2009
Acanthocephala	<i>Cystacanth</i> sp.	<i>Leptodactylus ocellatus</i>	Cavidade celomática	3	31	TO	Goldenberg <i>et al</i> , 2009
Acari	<i>Amblyomma rotundatum</i>	<i>Rhinella icterica</i>	Superfície corporal	63	32	RJ	Luque <i>et al</i> , 2005

ANEXO C – Identificação de metazoários

Os parasitas encontrados durante as necropsias foram identificados conforme as características morfológicas descritas na compilação de Vicente *et al* (1991):

Nematódeos

1. “Família Cosmocercidae (Travassos, 1925): nematóides que geralmente apresentam dimorfismo sexual acentuado. Machos sem ventoso pré-anal, com espículas subiguais, longos ou rudimentares, gubernáculo presente, rudimentar ou ausente. Fêmeas didelfas, proelfas ou anidelfas, ovíparas ou vivíparas.

1.1 Gênero Aplectana (Raillet & Henry, 1916): boca com dois pequenos lábios providos de armadura quitinosa. Esôfago com pequena faringe e com bulbo posterior, sem válvulas quitinosas. Poro excretor pré-bulbar. Vulva mediana. Aparelho genital feminino prodelfo. Machos com dois espículos sub-iguais e gubernáculo mais ou menos quitinizado, podendo em algumas espécies faltar. Cauda cônica, mais ou menos alongada e com numerosas papilas ventrais pré e pós anais.

1.2 Gênero Cosmocerca (Diesing, 1861): boca trilabiada, lábios pequenos, tendo cada um, uma armadura quitinosa em forma de V. Asa lateral bem desenvolvida, estendendo-se até o ânus na fêmea. Poro excretor pré-bulbar. Esôfago com pequena faringe e bulbo posterior com válvulas quitinosas. Vulva mediana, aparelho genital feminino prodelfo. Machos com dois espículos pequenos e rudimentares e gubernáculo subtriangular. Asas caudais ausentes, numerosas papilas pequenas na face ventral e duas séries de formações quitinosas (plectanas) características.

2. Família Molineidae (Durette-Desset & Chabaud, 1977): corpo mais ou menos filiforme. Extremidade anterior sem anel bucal, dilatação cutical cefálica geralmente presente. Macho com bolsa copuladora bem

desenvolvida, sem raio dorsal. Espículos curtos e robustos, dotados de protuberância. Fêmea com vulva na parte posterior do corpo, com cauda em geral com espinho terminal

2.1 Gênero Oswaldocruzia (Travassos, 1917): cabeça com dilatação cuticular vesiculosa, dividida em duas partes: uma anterior mais larga e uma posterior mais estreita. Cutícula com fina estriação transversal e linhas longitudinais. Boca guarnecida com lábios indistintos e limitando diminuta cavidade não quitinizada. Asas cervicais presentes ou ausentes. Papilas cervicais delgadas abaixo do meio do esôfago. Fêmeas com vulva na metade posterior do corpo, não salientes. Aparelho genital anfidelfo. Extremidade posterior terminada por um espinho cuticular. Ovos em mórula no útero. Machos com bolsa copuladora grande e com lobo dorsal triangular. Papilas pré bursais não observadas. Espículas de forma complexa, constituído por 4 ou 5 processos distais, reunidos por uma membrana hialina. Gubernáculo ausente.

3. Família Oxyascarididae (Travassos 1920) Freitas 1958: machos menores que as fêmeas. Asas laterais presentes ou ausentes. Lábios muito reduzidos, sem cápsula bucal. Esôfago com um ventrículo periforme ou terminado em um bulbo glandular. O intestino pode terminar em um reto piriforme volumoso muito quitinizado. Ventosa pré cloacal presente. Espículas iguais, pequenos, pouco quitinizados. Gubernáculo ausente ou presente. Asa caudal ausente. Algumas papilas caudais presentes. Vulva na parte anterior ou posterior do corpo. Úteros opostos. Ovos embrionados ou não, quando eliminados.

3.1 Gênero Oxyascaris (Travassos, 1920): boca com três lábios, asas laterais ausentes, seguido de um ventrículo glandular. Machos com cauda cônica, sem asas caudais. Três pares de papila pré e pós anais. Ventosa pré cloacal ausente. Espículas

iguais, gubernáculo ausente. Fêmeas com cauda digitiforme. Vulva situada um pouco anteriormente à metade do corpo.

3.2 Gênero *Pteroxyascaris* (Freitas, 1958): asas laterais presentes em ambos os sexos. Machos com seis pares de papilas pré e sete pares de papilas pós anais. Gubernáculo ausente.

4. Família *Strongyloididae* (Chitwood & McIntosh, 1934): esôfago longo sem bulbo posterior, vulva no terço posterior do corpo

4.1 Gêneros *Strongyloides* (Grassi, 1879): cápsula bucal presente ou ausente, esôfago longo, estreito, algumas vezes alargado posteriormente, mas sem bulbo. Cauda curta, vulva no terço posterior do corpo. Ovos embrionados ou contendo larvas.

5. Família *Rhabdiasidae* (Railliet, 1915): apresentam esôfago curto com bulbo posterior e vulva no meio do corpo.

5.1 Gênero *Rhabdias* (Stiles & Hassal, 1905): boca rodeada por seia lábios muito pequenos, algumas vezes com asas laterais que são largas anterior e posteriormente. Cápsula bucal pequena na forma de taça. Esôfago pequeno, cilíndrico, terminando em uma dilatação posterior, Cauda cônica, vulva próxima ao meio do corpo. Ovos de casaca fina contendo uma mórula ou uma larva pouco desenvolvida.