

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE POSSÍVEL AGENTE PATOGÊNICO CAUSADOR DE MORTALIDADE EM IMAGOS DE *Rana catesbeiana* Shaw, 1802.

(ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A POSSIBLE PATHOGENIC AGENT RESPONSIBLE FOR MORTALITY IN TADPOLES OF *Rana catesbeiana* Shaw, 1802)

(AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL POSIBLE AGENTE PATÓGENO CAUSANTE DE MORTALIDAD EN IMAGOS DE *Rana catesbeiana* Shaw, 1802)

J. L. P. MOURINO⁵, T. URBANO¹, M. L. MARTINS², J. FENERICK Jr⁵,
R. P. SCHOCKEN-ITURRINO³, M. V. STÉFANI⁴.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar o patógeno causador de mortalidade em imagos de *Rana catesbeiana*, ocorrido no ranário experimental do Centro de Aqüicultura da Unesp - Jaboticabal. Durante um surto de mortalidade, 20 imagos que apresentavam prostração, anorexia, pele ressecada e edemas cutâneos foram abatidos e submetidos ao procedimento padrão de necropsia. Foram assepticamente coletadas amostras de coração, fígado, swab da cavidade abdominal e conteúdo do trato gastrintestinal, sendo posteriormente semeadas em meios de cultura seletivos para diferentes bactérias. Foi observado crescimento de colônias características de *Escherichia coli* em placas com meio seletivos EMB e Mac Conkey, as quais foram submetidas a séries bioquímicas para identificação e tipificação, que confirmaram se tratar de *E. coli*. Cepas obtidas a partir das colônias isoladas, foram semeadas em placas contendo ágar-sangue e apresentaram hemólise, o que caracteriza as bactérias como patogênicas, sendo assim a *E. coli* uma possível responsável pelo surto de mortalidade.

PALAVRAS-CHAVE: *Rana catesbeiana*. *Escherichia coli*. Mortalidade.

SUMMARY

This study aimed isolating and characterizing the pathogen responsible for the mortality of *Rana catesbeiana* tadpoles that occurred in the Experimental Aquaculture Center of São Paulo State University (Unesp), Campus of Jaboticabal, Brazil. During a mortality outbreak, twenty tadpoles presenting prostration, anorexia, and dried and swollen skin were killed and submitted to post-mortem examination. Heart, liver, abdominal cavity, and bowel samples were aseptically collected. The materials were plated onto a selective medium for different bacteria. Colonies characteristic of *Escherichia coli* were seen in dishes with EMB and Mac Conkey selective mediums. Biochemical series identified and characterized the presence of *E. coli*. Strains obtained from isolated colonies were plated onto Petri dishes with Blood Agar, resulting in hemolysis, which is a characteristic of pathogenic bacteria. Therefore, *E. coli* could be ascribed as one of the responsible agents for the death outbreak.

¹ Pós-Graduando (Msc) em Zootecnia, FCAV – Unesp - Campus de Jaboticabal, SP.

² Professor Titular do Departamento de Aqüicultura, CCA - UFSC, Florianópolis, SC.

³ Professor Titular do Departamento de Patologia da FCAV - Unesp - Campus de Jaboticabal, SP.

⁴ Professor Assistente Doutor do Departamento de Zootecnia da FCAV - Unesp - Campus de Jaboticabal, SP.

⁵ Zootecnista, Msc.

KEY -WORDS: *Rana catesbeiana*. *Escherichia coli*. Mortality.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo aislar y caracterizar el patógeno causante de mortalidad en imagos de *Rana catesbeiana*, ocurrida en el ranario experimental del Centro de Acuicultura de la FCAV/UNESP-Jaboticabal, SP, Brasil. Durante un brote de mortalidad, 20 imagos que presentaban postración, anorexia, piel reseca y edemas cutáneos fueron abatidos y sometidos a los procedimientos estándar de necropsia. Fueron asépticamente colectadas muestras de corazón, hígado, hisopos de la cavidad abdominal y contenido del tracto gastrointestinal, siendo posteriormente sembradas en medios de cultivo selectivos para diferentes bacterias. Fue observado crecimiento de colonias características de *Escherichia coli* en las placas con medio selectivo EMB y Mc Conkey, las cuáles fueron sometidas a series bioquímicas para la identificación y tipificación, que confirmaron que se trataba de *E. coli*. Las cepas obtenidas a partir de las colonias aisladas fueron sembradas en placas de Agar Sangre y presentaron hemólisis, lo que caracteriza las bacterias como patogénicas. De esta forma, la *E. coli* es la posible responsable por el brote de mortalidad.

PALABRAS-CLAVES: *Rana catesbeiana*. *Escherichia coli*. Mortalidad.

INTRODUÇÃO

Com o avanço da tecnologia, a ranicultura vem consolidando-se como uma atividade rentável, por propiciar retorno econômico aos produtores em razão do elevado preço da carne de rã no mercado, que é o principal produto na atividade, e que possui excelente valor e qualidade nutricional (LIMA e AGOSTINHO, 1992). Porém, essa cultura vem enfrentando dificuldades devidas às altas taxas de mortalidade, observadas principalmente, no final da metamorfose, decorrente possivelmente de desnutrição, estresse, instalações e manejo inadequados, bem como controle sanitário deficiente (SOUZA et al., 1994).

Em seu habitat natural, raramente as doenças infecciosas serão parte dominante na vida dos anfíbios, pois são animais solitários, que rapidamente são consumidos por predadores (ELKAN, 1976). Na criação intensiva, as bacterioses geralmente estão associadas à má qualidade da água, em decorrência do excesso de matéria orgânica na água, más condições de higiene dos recipientes de criação, excesso de sobras alimentares, restos de pele, bem como deficiente circulação de água. Em animais aquáticos é difícil estabelecer, com exatidão, quais os agentes responsáveis pelas enfermidades, sendo esses mais comumente encontrados na microbiota do trato gastrointestinal, ou no ambiente, onde se apresentam oportunistas (HIPOLITO, 1994). Segundo Souza et al. (1994), o conhecimento dos fatores causadores de doenças nesses animais ainda é muito incompleto.

As bacterioses merecem especial atenção, pois são responsáveis pela maioria dos surtos de mortalidade ocorridos em populações de rãs. Embora exista uma longa lista de bactérias patogênicas, somente poucas parecem apresentar importância (REICHENBACH-KLINKE e ELKAN, 1965). Existe a hipótese de que doenças

septicêmicas de animais aquáticos são resultado da interação de um ou mais grupos de bactérias comuns ao ambiente aquático (HIPOLITO, 1989). Dentre estes grupos está a família das *Enterobacteriaceae*, causadoras de doenças como a perna vermelha (red-leg), causada pelas bactérias *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa* (SOUZA et al., 1994). Essa doença recebe este nome em virtude da aparência hemorrágica, observada principalmente, nas pernas dos animais comprometidos, manifestando-se também na parede abdominal. Na família das *Enterobacteriaceae* há linhagens não patogênicas de *Escherichia coli*, que são habitantes do trato intestinal de seres humanos e animais, permanecendo no lúmen intestinal sem causar nenhum dano, entretanto, em organismos imunossuprimidos ou debilitados, podem causar infecções (NATARO e KAPER, 1998).

Um passo essencial no estudo de qualquer doença é o isolamento e classificação dos organismos que comprometem a saúde dos animais, principalmente os cultivados (GIBBS e GIBBS, 1966). Por isso, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar o patógeno causador de mortalidade em rã-touro (*Rana catesbeiana*) de cultivo, na fase final de transformação.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante um surto de mortalidade de imagos em fase de metamorfose, ocorrido no ranário experimental do Centro de Aquicultura da Unesp, foram coletados 20 animais que apresentavam prostração, anorexia, pele ressecada e edemas cutâneos. Estes foram encaminhados para o Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp, Campus de Jaboticabal, para posterior análise microbiológica. Após abater e submeter os animais ao procedimento padrão de

necropsia, foram assepticamente coletadas amostras de fígado, coração, swab da cavidade abdominal e conteúdo do trato gastrointestinal. As amostras de fígado e coração foram maceradas em água peptonada 1% e semeadas em meios de cultura seletivos para diferentes bactérias, a fim de isolar o possível agente causador da enfermidade. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras de conteúdo gastrointestinal e swab da cavidade abdominal. Para o isolamento das bactérias do gênero *Enterobacteriaceae*, as amostras foram semeadas em placas de petri contendo meio seletivo de ágar Mac Conkey e incubadas a 37°C, em aerobiose, por 24 horas. Após esse período de incubação, foi observado se havia colônias vermelhas (fermentadoras da lactose), características de *E. coli*, em meio seletivo ágar Mac Conkey (MANUAL DIFCO, 1997). As amostras também foram semeadas em placas de Petri contendo meio seletivo Ágar EMB (eosina azul de metileno), sendo incubadas a 37°C, em aerobiose, por 24 horas. Após esse período foi verificado se havia a presença de colônias de aproximadamente 2 a 3 mm de diâmetro e com viço verde metálico, também características de *E. coli* em Ágar EMB (MANUAL DIFCO, 1997). Após o isolamento das colônias suspeitas, estas foram submetidas à verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram e posteriormente repicadas em tubos com tampa de rosca contendo caldo BHI reduzido (Brain Heart Infusion, Difco)

O processo de identificação e tipificação das cepas obtidas a partir das colônias isoladas, foi realizado a partir da série bioquímica: indol, vermelho de metila, Voges-Proskauer, citrato-Simmons, H₂S, urease, motilidade, fenilalanina, glicose com gás e lactose (GUERREIRO et al., 1984). Juntamente aos testes bioquímicos, as colônias isoladas foram semeadas em placas de petri contendo ágar-sangue para teste de hemólise. O teste de toxidez foi realizado através da inoculação de um “pool”, confeccionado a partir das cepas isoladas, em imagos com mesma fase de crescimento que os animais acometidos pela bacteriose, sendo posteriormente realizado o processo de reisolamento das bactérias a partir do conteúdo intestinal dos imagos inoculados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realização das necropsias ficou evidenciado que os imagos apresentavam hiperemia cutânea, principalmente nas extremidades do corpo; o fígado, baço e rins freqüentemente apresentavam-se aumentados e, em alguns casos, o fígado estava pálido, com múltiplos pontos brancos. Sinais clínicos similares, incluindo anorexia, hiperemia cutânea, edemas periféricos e morte repentina, também foram relatados por Manuel et al. (2002), que associaram esses sintomas em rãs à presença de *Streptococcus inae*.

Pela análise microbiológica das amostras de fígado, coração e swab da cavidade abdominal, foram isoladas colônias vermelhas (fermentadoras da lactose), características de *E. coli* em placas de petri contendo meio seletivo de Mac Conkey. Foram também observadas, em placas de petri contendo meio seletivo Ágar EMB, colônias de aproximadamente 2 a 3 mm de diâmetro apresentando viço verde metálico, com aspecto e coloração característicos de *E. coli*. Os esfregaços corados pelo método de Gram confirmaram a presença de bastonetes Gram-negativos. Foi também observado crescimento de colônias suspeitas nas placas de petri onde foram semeadas amostras do conteúdo gastrointestinal, porém esse material não foi utilizado nas análises posteriores, pois a *E. coli* é um habitante do trato intestinal desses animais, conforme citado por (NATARO e KAPER, 1998).

As colônias suspeitas isoladas foram submetidas a uma série bioquímica para identificação e tipificação, e apresentaram os seguintes resultados: produção de indol, produção de vermelho de metila, Voges-Proskauer negativo, citrato-Simmons negativo, não produção de H₂S, urease negativa, motilidade positiva, fenilalanina negativa, glicose com gás positivo, lactose positiva e hemólise positiva, confirmando a presença de *E. coli*. As cepas elaboradas a partir das colônias isoladas, foram semeadas em placas contendo ágar-sangue, apresentaram-se hemolíticas, o que caracteriza as bactérias como patogênicas.

A inoculação, por via oral e intraperitonal, de um “pool” elaborado a partir das cepas isoladas, provocou a morte dos imagos no período de 24 a 48 horas após a inoculação. Após a morte desses animais inoculados, foi realizada uma nova necropsia e retirado o conteúdo intestinal, do qual foi reisolado o patógeno, conforme a metodologia anteriormente descrita.

Segundo Hanselmann et al. (2004), o fato de as rãs defecarem na água onde são criadas, torna possível que outras rãs venham a ser infectadas, principalmente se houver lesões na pele desses animais. A forma mais eficiente de gerenciar os problemas relacionados à qualidade da água é proporcionar uma boa renovação de água, além de diminuir a densidade de criação (MAUEL et al., 2002).

Resultados obtidos por (MAUEL et al., 2002) demonstraram que a utilização de antibióticos reduz a mortalidade em caso de surto, porém a sua utilização na criação comercial de rãs não é econômica e logisticamente viável devido às proporções dos ranários. Portanto, as principais formas de tratamento estão ligadas a medidas preventivas e, em uma situação de perda de animais, recomenda-se um reforço alimentar com imunoestimulantes, retirada imediata de animais moribundos, aumento do fluxo de água e melhora nas ações sanitárias.

CONCLUSÃO

Os achados desse estudo sugerem que inúmeras bactérias patogênicas podem estar associadas ao quadro clínico descrito. Porém, constatou-se que bactérias do gênero *Escherichia coli* foram as possíveis responsáveis pelo surto de mortalidade em imagos, enfatizando a importância de estudos que envolvam processos patológicos na ranicultura.

ARTIGO RECEBIDO: Junho/2003
APROVADO: Junho/2005

REFERÊNCIAS

- ELKAN, E. **Pathology in the amphibian**: some interesting pathological cases in amphibians. London: Academic Press, 1976. p.273-331.
- GUERREIRO, M. G., Mary, A. **Bacteriologia especial**. Porto alegre: Editora Sulina, 1984, p.04.
- GIBBS, E. L., GIBBS T. J. *Rana pipens*: Health and disease. **Laboratorial Animal Care**, v.16, p. 142-160, 1966.
- HANSELMANN, R., RODRÍGUEZ, A., LAMPO, M., FAJARDO-RAMOS, L., AGUIRRE, A., KILPATRICK, M. A., RODRÍGUEZ, J. P., DASZAK, P. Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. **Biological Conservation**, v.120, p.115-119, 2004.
- HIPÓLITO, M. Alguns aspectos bacteriológicos de doenças em animais aquáticos de sangue frio. In: ENCONTRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, São Paulo. 1989. **Anais...** p.5-10.
- HIPÓLITO, M. Patologia e manejo sanitário dos organismos aquáticos. **ABC-RÃ**, São Paulo, v.1, p.1-2, 1994.
- LIMA, S. L., AGOSTINHO, C. A. **A tecnologia de criação de Rãs**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1992. 168p.
- MANUAL DIFCO LABORATORIES. **Product catalog for microbiology**, 1996/1997.
- MANUEL, M. J., MILLER, D. L., FRAZIER, K. S., HINES II, M. E. Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Journal Veterinarian Diagnostic Investigation**, v.14, p.431-433, 2002.
- NATARO, J. P., KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.142-201, 1998.
- REICHENBACH-KLINKE, H., ELKAN, E. **The principal diseases of lower vertebrates**. London: Academic press, 1965. p. 221-320.
- SOUZA, J. R., MARTINS, M. L., HIPOLITO, M. **Anfibios**: manual para técnicas em Bioterismo. 2. ed., São Paulo: CE/Cobea/Finep, 1994. 3p.