

Notas Científicas

Isolamento de *Aeromonas hydrophila* em girinos de rã-touro na metamorfose

José Luiz Pedreira Mourinho⁽¹⁾, Maurício Laterça Martins⁽²⁾, Marcela Maia Yamashita⁽²⁾, Cleide Rosana Vieira Batista⁽³⁾ e Murilo Anderson Pereira⁽³⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Lab. de Camarões Marinhos, Rua Beco dos Coroas s/nº, CEP 88062-601 Barra da Lagoa, Florianópolis, SC. E-mail: mourino@lcm.ufsc.br ⁽²⁾UFSC, Dep. de Aqüicultura, Rod. SC 404, Km 3, Caixa Postal 476, CEP 88040-900 Florianópolis, SC. E-mail: mlaterca@cca.ufsc.br, marcelayamashita@yahoo.com.br ⁽³⁾UFSC, Dep. de Microbiologia. E-mail: cbatista@mbox1.ufsc.br, mapnutri@cca.ufsc.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi isolar o agente causador da doença-da-perna-vermelha em girinos de *Rana catesbeiana* em fase de transformação. Coletaram-se 20 girinos, na fase G4, apresentando prostração, anorexia, pele ressecada, pernas posteriores hemorrágicas e natação errática. Amostras do coração, fígado e partes da perna foram inoculadas em meio de cultura ágar tripton de soja e ágar sangue, a 25°C, por 48 horas. *Aeromonas hydrophila* foi a principal causa do surto de mortalidade. A fim de avaliar o efeito dessa bactéria nos girinos, realizou-se inoculação por via oral e intraperitoneal de 10⁶ unidades formadoras de colônia por mililitro, e verificou-se o aparecimento de petéquias hemorrágicas na boca e nos órgãos internos.

Termos para indexação: *Rana catesbeiana*, infecção.

Isolation of *Aeromonas hydrophila* in bullfrog tadpoles in the transformation stage

Abstract – This work aimed to isolate the pathogen responsible for red-leg disease in tadpoles of *Rana catesbeiana* in their transformation stage. Twenty animals in G4 stage were collected presenting prostration, anorexia, desiccated skin, hemorrhagic legs and erratic swimming. The bacteria were isolated from samples of heart, liver and legs on tryptone soy agar and blood agar at 25°C for 48 hours. *Aeromonas hydrophila* was the main responsible for mortality. To evaluate the effect of bacterium, the tadpoles were orally and intraperitoneally infected with 10⁶ CFU mL⁻¹. The appearance of haemorrhagic petechiae on the mouth and internal organs were verified.

Index terms: *Rana catesbeiana*, infection.

A ranicultura é uma atividade que vem se consolidando, graças ao avanço da tecnologia, e oferece possibilidade de retorno econômico aos produtores, em virtude do elevado preço da carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*) e de sua excelente qualidade nutricional (Lima & Agostinho, 1992). Essa criação, porém, enfrenta dificuldades pelas altas taxas de mortalidade observadas, principalmente, no final da metamorfose, decorrente de desnutrição, estresse, instalações e manejo inadequados (Souza Junior & Hipolito, 2001).

As bacterioses são a causa da maioria das mortes em populações de rãs. *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa* são as principais responsáveis pela doença-da-perna-vermelha (Souza Junior & Hipolito, 2001). Essa doença se caracteriza,

além das hemorragias, por úlceras nas patas, dedos, mandíbula e pele. Nos girinos, ocorrem principalmente pontos hemorrágicos e ulcerações na cauda e hemorragias nas pernas emergentes (Glorioso et al., 1974).

Este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar *Aeromonas hydrophila*, causadora de mortalidade em girinos de rã-touro, em fase de transformação, a fim de estabelecer sua epidemiologia e utilizar métodos de controle e profilaxia.

Foram coletados 20 girinos de rã-touro, na fase G4, durante um surto de mortalidade ocorrido no laboratório de cultivo experimental do Dep. de Aqüicultura, da UFSC. Os animais apresentavam prostração, anorexia, pele ressecada, pernas posteriores com aparência

hemorrágica, alteração no comportamento e natação errática. Amostras do coração, fígado e partes da perna foram inoculadas em meios de cultura ágar tripton de soja (TSA) e ágar sangue e incubadas a 25°C, por 48 horas (Popoff, 1984).

Os testes bioquímicos realizados foram: ferro três-açúcares (TSI), para verificar a produção de ácido sulfídrico (H₂S) a partir de tiosulfato, citrato de Simmon (Simmons, 1926), urease (Christensen, 1949), arginina, lisina, ornitina, produção de indol, vermelho de metila (MR), produção de acetilmetilcarbinol, pelo teste de Voges-Proskauer (VP) (Eddy, 1961), hidrólise de gelatina (Levine & Carpenter, 1923) e esculina. Realizou-se também teste para catalase (3% H₂O₂), oxidase e motilidade. Colônias isoladas foram semeadas em placas de Petri com ágar sangue para teste de hemólise. O teste de toxicidade foi realizado por meio da inoculação oral e intraperitoneal de 10⁶ UFC mL⁻¹ da cepa isolada em 20 girinos com a mesma fase de crescimento que os animais acometidos pela bacteriose. O período de observação foi de 24 a 48 horas depois da inoculação.

Isolaram-se colônias com coloração marrom-escuro (Hanninen et al., 1995) de *Aeromonas hydrophila* em placas de TSA e ágar sangue. Os esfregaços, corados pelo método de Gram, confirmaram a presença de bastonetes Gram-negativos. A análise de oito dessas colônias suspeitas, submetidas à série bioquímica, caracterizou a bactéria *A. hydrophila* de acordo com os resultados dos testes propostos por Popoff (1984) e Abeyta Júnior et al. (1990) (Tabela 1).

A inoculação por via oral e intraperitoneal de 10⁶ UFC mL⁻¹, a partir das cepas isoladas, provocou petéquias hemorrágicas na boca de todos os animais que foram inoculados via oral, e petéquias hemorrágicas nos órgãos internos dos animais que receberam injeção

intraperitoneal. *Aeromonas hydrophila* tem sido a principal causa de infecção em rãs, comprometendo a saúde do animal, seja ele mantido em cativeiro ou no ambiente natural. Vadivelu et al. (1995) também isolaram o microrganismo do fígado, músculo, coração e baço de rãs e da pele de girinos. Huys et al. (2003) observaram *A. hydrophila ranae* como causadora de septicemia em *R. rugulosa*, e Mauel et al. (2002) observaram hiperemia cutânea e subcutânea e edema em *R. catesbeiana*, assim como observado neste trabalho.

Glorioso et al. (1974) relataram mortalidade de 70% durante a metamorfose de girinos de *R. catesbeiana*, acompanhada por hemorragia na cauda, sangue subcutâneo e úlceras no tecido cutâneo abdominal. Rafidah et al. (1990), por sua vez, reportaram 80% de mortalidade em *R. catesbeiana* na Malásia. Cunningham et al. (1996) verificaram a infecção por *A. hydrophila* em *Rana temporaria* no Reino Unido, também provocando hemorragias e ulcerações. Vadivelu et al. (1995) comentaram que bactérias do gênero *Aeromonas* produzem toxinas e enzimas que variam de acordo com a origem do isolado. Neste trabalho, a cepa da bactéria isolada a partir dos girinos em transformação comprovou sua patogenicidade, depois da inoculação experimental.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela concessão de Bolsa ao segundo e terceiro autores.

Referências

ABEYTA JÚNIOR, C.; KAYSNER, C.A.; WEKELL, M.M.; STOTT, R.F. Incidence of motile aeromonads from United States West Coast shellfish growing estuaries. **Journal of Food Protection**, v.53, p.849-855, 1990.

CHRISTENSEN, W.B. **Hydrogen sulfide production and citrate utilization in the differentiation of enteric pathogens and coliform bacteria**. Greeley, Co: Weld County Health and Environment Department, 1949. 16p. (Research bulletin, 1).

CUNNINGHAM, A.A.; LANGTON, T.E.S.; BENNETT, P.M.; LEWIN, J.F.; DRURY, S.E.N.; GOUGH, R.E.; MacGREGOR, S.K. Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B, Biological Sciences**, v.351, p.1539-1557, 1996.

EDDY, B.P. The Voges-Proskauer reaction and its significance: a review. **Journal of Applied Bacteriology**, v.24, p.27-41, 1961.

Tabela 1. Caracterização fenotípica de *Aeromonas hydrophila* isolada de girinos de rã-touro.

Teste	Reação	Teste	Reação
Produção de ácido	-	Indol	+
Manitol	+	Oxidase	+
Sacarose	+	Catalase	+
Arabinose	-	Esculina	+
Citrato de simmon	+	Hidrólise de gelatina	+
Urease	+	VP	+
H ₂ S	-	Vermelho de metila	+
Arginina	+	Motilidade	+
Lisina	+	TCBS	+
Ornitina	-		

- GLORIOSO, J.C.; AMBORSKI, R.L.; AMBORSKI, G.F.; CULLEY, D.D. Microbiological studies on septicemic bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **American Journal of Veterinary Research**, v.35, p.1241-1245, 1974.
- HANNINEN, M.L.; RIDELL, J.; HIRVELA-KOSKI, V. Phenotypic and molecular characteristics of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolated in Southern and Northern Finland. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, p.12-21, 1995.
- HUYS, G.; PEARSON, M.; KAMPFER, P.; DENYS, R.; CNOCKAERT, M.; INGLIS, V.; SWINGS, J. *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicaemic farmed frogs in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.885-891, 2003.
- LEVINE, M.; CARPENTER, D.C. Gelatin liquefaction by bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.8, p.297-306, 1923.
- LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A.A. **Tecnologia de criação de rãs**. Viçosa: Ed. Imprensa Universitária/UFV, 1992. 168p.
- MAUEL, M.J.; MILLER, D.L.; FRAZIER, K.S.; HINES, M.E. Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.431-433, 2002.
- POPOFF, M. Genus III. *Aeromonas* Kluyver and Van Niel. In: DRIEG, N.R. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v.1, p.545-548.
- RAFIDAH, J.; ONG, B.L.; SAROJA, S. Outbreak of "red leg": an *Aeromonas hydrophila* infection in frogs. **Journal of Veterinary Malaysia**, v.2, p.139-142, 1990.
- SIMMONS, J.S. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolating of certain fungi. **Journal of Infectious Diseases**, v.39, p.209-241, 1926.
- SOUZA JUNIOR, F.L.; HIPOLITO, M. Manejo sanitário de criação de rãs. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 11., 2001, Bragança Paulista, SP. **Anais**. Bragança Paulista: Abetra, 2001. p.1-34.
- VADIVELU, J.; PUTHUCHEARY, S.D.; PHIPPS, M.; CHEE, Y.W. Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Medical Microbiology**, v.42, p.171-174, 1995.

Recebido em 4 de maio de 2005 e aprovado em 3 de abril de 2006