

## RESUMO

Efetuuou-se análises bacteriológicas em material proveniente de dois espécimens de rãs-touro com a finalidade de se verificar qual o possível agente responsável pela patologia manifestada em um ranário da cidade de Belém, Pará. Os resultados indicam a presença de *Staphylococcus aureus*.

## INTRODUÇÃO

O animal de sangue frio oferece um vasto campo de trabalho científico, mas são poucos os pesquisadores que se dedicam ao estudo de sua biologia. A fisiologia e habitat destes animais são completamente diferentes daqueles hospedeiros normalmente utilizados em experimentos microbiológicos. É difícil fazer comparação de sua manifestação biológica com as de animais homeotérmicos (Moreno *et al.*, 1973).

Rãs usadas extensivamente como animais experimentais em pesquisa, estão sujeitas à mortalidade em massa sob ambas as condições natural e de laboratório (Gibbs *et al.*, 1971). A causa imediata de mortes nos animais doentes parece ser toxemia bacteriana (Culley, Jr. *et al.*, 1978). A ameaça mais séria para a saúde dos mesmos é uma forma epizootica de septicemia bacteriana usualmente acompanhada de ulceração cutânea, designada por Emerson & Morris (1905) como "red-leg". A interpretação e desenvolvimento subsequente de um tratamento bem sucedido requer a identificação da bactéria envolvida no processo da doença (Culley, Jr. *et al.*, 1978). O número e variedade de germes isolados de rãs doentes e a falta de uniformidade de respostas do hospedeiro têm sido as bases de algumas questões pelo que respeita o significado e validade das observações (Gibbs, 1973). Embora estas objeções possam ser cuidadosamente avaliadas, um relato feito por Evans (1976) indica que os dados sob a questão não são raros e que há limitações que podem ser reconhecidas nas buscas de relação de algumas doenças, como: a) o mesmo estado clínico ou patológico pode ser produzido por diferentes agentes etiológicos; b) os agentes causais podem variar em diferentes áreas geográficas, por diferentes grupos etários, ou com

---

(\*) Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém-PA.

diferentes exemplos de suscetibilidade de hospedeiro; c) a expressão de algumas doenças podem requerer a presença de dois ou mais agentes ou co-fatores agindo juntos; d) um único agente pode produzir resposta clínica ou patológica em diferentes situações; e) qualquer causa em uma série de agentes causais usualmente produz uma mudança biológica de resposta que pode variar ou qualquer reação detectável, para moderar mudanças clínicas ou patológicas, para doença clássica ou reconhecida; f) a natureza e a severidade da resposta do hospedeiro seguindo revelação para uma variedade de agentes infecciosos com certas características do hospedeiro e influências ambientais. Estes dados confirmam a tese que doença septicêmica de rã resulta da interação entre as rãs e um grupo de bactérias conhecidas como ubíquas no ambiente aquático (Sindermann, 1974; Amborski et al., 1974a). O grupo dos patógenos *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Proteus* sp. e *Flavobacterium* sp. são ubíquos no ambiente aquático e tem sido sugerido que membros deste grupo são oportunistas (Snieszko, 1964). Assim, apesar dos animais aquáticos estarem constantemente interagindo com estes patógenos, a doença resulta somente sob condições que ainda não têm sido definidas plenamente. A ubiquidade de bactérias potencialmente patogênicas no ambiente aquático conduz à sugerir que a bactéria responsável pela doença de rãs foi derivada de fontes exógenas (Culley, Jr. et al., 1978). Tem sido sugerido ainda, que a excreção de organismos dentro da água de substâncias das rãs proporcionou um caminho em que outras rãs, ou ainda a mesma rã, seria infectada, especialmente em presença de lesões da pele (Kulp & Borden, 1942). Se isto fosse verdadeiro, então o germe no sangue refletiria os patógenos potenciais ou da flora intestinal ou da água de subsistência das rãs a um espaço específico de tempo (Glorioso et al., 1974a). Russel (1898) foi pioneiro em transmitir a doença em rãs introduzindo o germe *Aeromonas hydrophila* dentro da água onde os animais eram mantidos. Estas observações foram confirmadas por Emerson & Morris (1905). Glorioso et al. (1974a) informaram a morte de 50% das rãs, dentro de 20 horas após terem emergido as mesmas em uma suspensão individual dos germes *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* e *Flavobacterium* sp., sem contudo, terem conseguido determinar o fator tóxico. A literatura indica que espécies patogênicas de *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* podem ser rotineiramente isoladas do trato digestivo de rãs aparentemente saudáveis (Glorioso et al., 1974a).

Contudo, a questão da colonização bacteriana do trato intestinal destes animais não tem sido clara (Carr et al., 1976). No trato respiratório superior, infecções por *Staphylococcus*, *Streptococcus* e bactéria gram negativa tem sido mostrado ser limitado pela flora indígena. Amborski et al. (1974a) isolaram bactérias pertencentes a um grupo não patogênico incluindo o *Staphylococcus aureus*, de rãs normais e doentes. Estes estudos não têm sido extensivos bastante para determinar a microbiota indígena destes animais, mas os resultados indicam a complexidade de possíveis interações.

O presente estudo teve por objetivo pesquisar o possível agente causador da patologia clínica manifestada em dois espécimens de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) em um ranário de Belém, Pará.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram recebidas para estudo amostras de coração, baço, fígado e músculos de dois espécimes de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) procedentes de um ranário em Belém-Pa. Os animais apresentaram hipertrofia nos músculos das patas dianteiras com lesões externas locais e destruição das juntas das patas traseiras tendo como consequência, fratura exposta e uma hiperemia na região ventral das patas, com morte no final de duas a três semanas. Não se obteve informações sobre o número total de animais envolvidos.

### Metodologia

Visando ao isolamento de eventuais germes aeróbios, as amostras foram semeadas a superfície de placas com os meios de cultura agar Mac Conhey, agar Salmonella-Shigella e agar simples (Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas em aerobiose. Para os germes que exigissem tensão aumentada de CO<sub>2</sub> foram utilizados os meios agar chocolate e agar sangue (10% de sangue de carneiro): As placas foram incubadas a 37°C em jarra de vela, durante 48 horas. Após o período de incubação, as placas incubadas em ambiente aeróbio e micro aerófilo foram examinadas, e as eventuais colônias desenvolvidas foram colhidas e, após comprovação da pureza, as bactérias foram identificadas segundo suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas em gênero e espécie. Os germes isolados foram submetidos aos métodos de caracterização e identificação de acordo com o Subcomitê Internacional de Taxonomia de *Staphylococcus* e *Micrococcus* (1965) e aos descritos por Baird-Parker (1974). As provas para verificar a produção de catalase foram feitas pelo método de Cowan & Steel (1977), utilizando-se caldo simples enriquecido com glicose a 1%, conforme recomendação da Baird-Parker (1966). Os controles desta prova foram feitos com culturas de *Staphylococcus epidermidis*, catalase-positiva, e de *Streptococcus faecalis*, catalase-negativa. Para a prova de oxidação e fermentação de glicose, além do tubo anaeróbico, para a prova de fermentação, foi usado um tubo de meio aeróbio, para a verificação de oxidação deste carboidrato, conforme indicação de Baird-Parker (1966). As espécies do gênero *Staphylococcus* foram diferenciadas pela prova de coagulase em tubo (coagulase livre), critério recomendado pelo Subcomitê Internacional (1965). Foram utilizadas para controle desta prova, culturas conhecidas de *Staphylococcus aureus*, coagulase-positiva, e de *Staphylococcus epidermidis*, coagulase-negativa. Os organismos foram também submetidos ao teste de susceptibilidade a drogas pelo método do disco, descrito por Bauer et al. (1966). Os antimicrobianos utilizados foram Cefalotina (30 mcg), Cloranfenicol (30 mcg), Eritromicina (15 mcg), Gentamicina (10 mcg), Kanamicina (30 mcg), Novobiocina (30 mcg), Oxacilina (10 mcg), Penicilina (10 U), e Tetraciclina (30mcg) (Difco).

## RESULTADOS

Os resultados estão expressos na Tabela 1

As amostras analisadas demonstraram a presença de **Staphylococcus aureus**.

De acordo com o Subcomitê Internacional (1965), foram consideradas como pertencentes ao gênero **Staphylococcus** as culturas constituídas de cocos gram-positivos, catalase positiva e capazes de produzir ácido, a partir de glicose, em anaerobiose (fermentação).

O germe apresentou-se resistente aos antimicrobianos Oxacilina e Penicilina. Nenhuma bactéria anaeróbia obrigatória foi isolada.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O diagnóstico da causa da doença em um animal aquático não é sempre óbvio (Amborski et al., 1974a). O papel das toxinas bacterianas no processo da doença septicêmica em rãs não tem evoluído, mas alguns casos explicam que os sintomas clínicos aparecem sem septicemia, sugerindo que a mesma só ocorre em casos extremos (Gibbs et al., 1966), ou ainda que a bactéria pode se localizar em tecidos específicos do animal, penetrando no sangue somente no último estágio da doença (Gibbs et al., 1966; Glorioso et al., 1974a). Segundo Wedemeyer (1970), um número de fatores físico, químico, ou biológico poderia exercer alterações no hospedeiro que favoreceria a colonização do germe no tecido do mesmo.

Diante destas hipóteses, nossos resultados indicando a presença do germe **Staphylococcus aureus** podem ser bastante representativos, uma vez que usamos como fonte de amostras, tecidos de rãs mortas, igualmente como outros pesquisadores (Russel, 1898; Amborski et al., 1974b; Eisinger, 1975).

Esta bactéria foi isolada de rãs mortas e doentes nos estudos feitos por Amborski et al. (1974a). Mesmo sendo considerado como não patogênico nos experimentos de Glorioso et al. (1974a), não podemos descartar a possibilidade do **Staphylococcus aureus**, detectado em nossos ensaios laboratoriais, ter interagido com as rãs no ambiente aquático e, na qualidade de oportunista, por um motivo ainda desconhecido, tenha desencadeado a infecção.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Universidade Federal do Pará, Departamento de Patologia, onde foram realizados todos os ensaios laboratoriais deste trabalho.

## SUMMARY

*Bacteriological analysis were made in material proceeding from two specimens of bullfrogs for found the possible etiological agent responsible to clinical pathology manifested in a froggerly in the city of Belém, Pará. The results indicated the presence of **Staphylococcus aureus**.*

**Tabela 1.** Resultados dos exames bacteriológicos realizados com amostras de dois espécimes de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) de um ranário em Belém, Pará.

	Staphylococcus aureus		
	nº positivos	%	nº negativo
Coração	1	50	1
Baço	1	50	1
Fígado	2	100	0
Músculos	2	100	0

Staphylococcus aureus em amostras de dois espécimes de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) de um ranário em Belém, Pará.

	Coração	Baço	Fígado	Músculos
nº 1	+	-	+	+
nº 2	-	+	+	+

#### Referências bibliográficas

- Amborski, G. F.; Amborski, R. L.; Glorioso, J. C. - 1974a. Factors influencing the bacterial diseases of poikilothermic aquatic animals. In: Amborski, R. L.; Hood, M. A.; Miller, R. R., eds. **Proceedings, Gulf Coast Regional Symposium on Diseases of Aquatic Animals**. Baton Rouge, Louisiana State University, Louisiana, Center for Wetland Resources. p. 19-33.
- Amborski, R. L.; Glorioso, J. C.; Amborski, G. F. - 1974b. Development of organ culture system for the study of an invasive gram positive organism infecting bullfrogs, *Rana catesbeiana*. In: Amborski, R. L.; Hood, M. A.; Miller, R. R., eds. **Proceedings, Gulf Coast Regional Symposium on Diseases of Aquatic Animals**. Baton Rouge, Louisiana, State University, Louisiana, Center for Wetland Resources. P. 217-224.
- Baird-Parker - 1966. Methods for classifying staphylococci and micrococci. In: Gibbs, B. M.; Skinner, F. A., eds. - **Identification Methods for Microbiologists**. London, Academic Press. p. 59-64.
- - 1974. Gram positive cocci. In: Buchanan, R. E.; Gibbons, N. E. - **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 8.ed., Williams & Wilkins. p. 258-478.
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. - 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. **American Journal Clinical Pathology**, 45(4):493-496.
- Carr, A. H.; Amborski, R. L.; Culley Jr., D. D.; Amborski, G.F. - 1976. Aerobic bacteria in the intestinal tracts of bullfrogs (*Rana catesbeiana*) maintained at low temperatures. **Herpetologica**, 32(3):239-244.
- Cowan, S. T. & Steel, S. - 1977. **Manual for the identification of medical bacteria**. 2. ed. Cambridge, Cambridge University Press.

- Culley Jr., D. D.; Horseman, N. D.; Amborski, R. L.; Meyers, S.P. - 1978. Current status of amphibian culture with emphasis on nutrition, diseases and reproduction of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. In: **Annual Meeting of the World Mariculture Society**, Atlanta, Georgia.
- Eisinger, R. W. - 1975. **Microbiological studies on septicemic bullfrogs (*Rana catesbeiana*)**. III. Isolation and characterization of Gram positive bacteria. M.S.Thesis. Baton Rouge, Louisiana State University, Louisiana.
- Emerson, H. & Norris, C. - 1905. Red-leg and infections disease of frogs. **Journal Experimental Medicine**, 7:32-58.
- Evans, A. S. - 1976. Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. **Yale Journal Biology and Medicine**, 49:175-195.
- Gibbs, E. L. - 1973. Healthier frogs. **Science**, 182:1201.
- Gibbs, E. L.; Nace, G. W.; Emmons, M. B. - 1971. The live frog is almost dead. **Bio-Science**, 21:1027-1034.
- Gibbs, E. L.; Gibbs, T. J.; Van Dyck, P. C. - 1966. *Rana pipiens*: health and disease. **Laboratory Animal Care**, 16:142-160.
- Glorioso, J. C.; Amborski, R. L.; Amborski, G. F.; Culley Jr., D. D. - 1974a. Microbiological studies on septicemic bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **American Journal of Veterinary Research**, 35:1241-1245.
- Kulp, W. L. & Borden, D. G. - 1942. Further studies on *Proteus hydrophilus* the etiological agent in "red-leg": disease of frogs. **Journal Bacteriology**, 44:673-679.
- Moreno, G.; Lopes, C. A.; Belluomini, H. E.; Pessoa, G. V. A.; Biasi, P.; Andrade, J.C. R. - 1973. Enterobactérias isoladas de anfíbios e répteis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 15(3):122-126.
- Russel, F. H. - 1898. An epidemic septicemic disease among frogs due to the *Bacillus hydrophilus fuscus*. **Journal of the American Medical Association**, 30:1442-1449.
- Sindermann, C. J. - 1974. Aquatic animal diseases: some critical issues. In: Amborski, R. L.; Hood, M. A.; Miller, R. R., eds. - **Proceedings, Gulf Coast Regional Symposium on Diseases of Aquatic Animals**. Baton Rouge, Louisiana, Louisiana State University, Center for Wetland Resources. p. 12.
- Snieszko, S. F. - 1964. Remarks on some facets of epizootiology of bacterial fish diseases. **Develop. Indust. Microbiol.**, 5:97-100.
- Subcomitee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci - 1965. Minutes of first meeting (5th-6th, october, 1964). **Int. Bull. Bact. Nomencl.**, 15:107-108.
- Wedemeyer, G. - 1970. **Symposium on Diseases of Fishes and Shell-fishes**. Washington, DC, American Fisheries Society.

(Aceito para publicação em 09.04.1989)