

SEPTICEMIA EM GIRINOS DE CRIAÇÃO NA FASE PRÉ-METAMÓRFICA

ROLANDO ALFREDO MAZZONI¹, ALBENONES JOSÉ DE MESQUITA², LUIZ FERNANDO FLEURY³, SANDRA PORTO DE MESQUITA⁴

¹Doutor, bolsista de Pós-doutorado da CAPES/PNPD, Goiânia, GO, Brasil - rolo1001@gmail.com

²Professor Doutor, Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

³Professor Mestre, Escola de Medicina da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

⁴Gerente do Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

RESUMO

O presente trabalho descreve um quadro septicêmico específico em girinos de rã touro (*Rana [Lithobates] catesbeiana* Shaw, 1802) na fase pré-metamórfica. Foram realizados estudos em três ranários comerciais do Estado de Goiás, incluindo avaliação clínica, necropsias, análises histopatológicas, microbiológicas, parasitológicas, moleculares e de microscopia eletrônica de transmissão. Foi identificado um quadro septicêmico, com edemas, ascite e sinais nervosos, mediado por cocos Gram-positivos. As lesões predominaram no fígado e rins, mas

também alcançaram outros órgãos internos. A lesão foi de tipo necrótico-degenerativo, com resposta inflamatória predominantemente de linfócitos mononucleares e formação de granulomas. A doença pode ser considerada como uma “septicemia estreptocócica secundária”. Não foi possível, nas condições deste estudo, determinar a causa primária que antecede a invasão dos tecidos pelos estreptococos, mas as condições de manejo intensivo aplicadas nos ranários comerciais possuem um papel de importância na predisposição às infecções.

PALAVRAS-CHAVE: estreptococos; girinos; (*Rana [Lithobates] catesbeiana*); septicemia.

SEPTICEMIA IN PRE-METAMORPHIC FARMED TADPOLES

ABSTRACT

Herein we describe septicemic outbreaks affecting pre-metamorphic bullfrog tadpoles (*Rana [Lithobates] catesbeiana* Shaw, 1802). The survey was performed in three commercial frog farms located in Goiás State. Clinical assessment and tadpole sampling for necropsy, histopathology, microbiology, parasitology, transmission electronic microscopy and molecular studies were performed. Septicemic outbreaks were characterized by edema, ascites and nervous signs. Main etiological agents

identified were Gram-positive cocci. Lesions were more prevalent in liver and kidney, but they were also found in other internal organs. Typical lesions were degeneration and necroses associated to mononuclear lymphocytes and granuloma formation. The disease may be considered as a “secondary streptococcal septicemia”. It was not possible to determine the primary cause preceding tissue colonization by streptococci, but the intensive husbandry practices might have an important role.

KEYWORDS: (*Rana [Lithobates] catesbeiana*); septicemia; streptococci; tadpoles.

INTRODUÇÃO

A ranicultura é uma atividade em expansão na América do Sul, sendo a rã-touro Americana

(*Rana [Lithobates] catesbeiana* Shaw, 1802) a espécie cultivada, introduzida no Brasil em 1935, mas as populações atualmente criadas foram originadas de 300 casais importados da América do

Norte em 1970 (MATHIAS & SCOTT, 2004). Em decorrência do clima favorável, da excelente adaptação da rã touro e da tecnologia desenvolvida pelos produtores e pesquisadores brasileiros, a ranicultura constitui uma atividade importante no Brasil, particularmente no Estado de Goiás.

Com o melhoramento nos conhecimentos sobre manejo e alimentação, a ranicultura transformou-se em uma atividade superintensiva, com altas densidades de população e com estrita dependência dos alimentos balanceados. Entretanto, os métodos intensivos de cultivo favoreceram o aparecimento de doenças que constituem uma ameaça para a viabilidade técnica e econômica dos criatórios de organismos aquáticos (ROTTMAN et al., 1992; BONDAD-REANTASO et al., 2005).

Doenças com alta mortalidade caracterizadas clinicamente por edemas e ascite têm sido observadas reiteradamente em girinos. Esses quadros podem estar ou não acompanhados de sintomatologia nervosa e, às vezes, as mortes ocorrem de forma súbita. É fato comum que, em um mesmo surto, ocorram os diversos quadros clínicos que compõem a síndrome.

As septicemias têm sido reportadas como a causa mais importante de mortalidade em anfíbios, sendo frequente animais serem encontrados mortos sem sintomas premonitórios. Septicemias por estreptococos ocorrem de forma esporádica ou epizootica em populações selvagens ou de criação em grande número de espécies aquáticas (ROMALDE et al., 2000; TORANZO et al., 2005). Diversos estudos realizados em rãs de criação têm relatado a presença de estreptococos associados a septicemias e surtos de mortalidade (GLORIOSO et al., 1974; AMBORSKI et al., 1983). A estreptococose tem sido identificada também em peixes como uma síndrome produzida por cocos Gram-positivos dos gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Vagococcus* (BERCOVIER et al., 1997; ELDAR et al., 1997). Particularmente, *S. iniae* tem sido indicado como o agente primário de doenças em diversas espécies de peixes e, ocasionalmente, de infecções em humanos, sendo considerada uma doença emergente (CDC, 1996; WEINSTEIN et al., 1997; GREENLEES et al., 1998; DURBOROW, 1999; LEHANE & RAWLIN, 2000; FULLER et al., 2001; LAU et al., 2003).

Existe, contudo, grande incerteza em relação às características dessas patologias em anfíbios devido aos seguintes fatores: 1) sinais clínicos inespecíficos (CRAWSHAW, 1994); 2) etiologia pouco clara revelando a presença de diversos agentes oportunistas que atuam de forma conjunta, sendo que, na maioria das vezes, habitam o ambiente dos animais afetados; 3) condições particulares de

manejo e alimentação artificial que, muito provavelmente, constituem causas predisponentes para transformação de um eventual agente comensal em um patógeno; e 4) falta de pesquisas sobre o tema dando continuidade aos estudos de casos (HIPÓLITO & BACH, 2002).

No entanto, diversas pesquisas têm indicado os vírus pertencentes à família *Iridoviridae*, gênero *Ranavirus* como produtores de doenças severas em anfíbios. Os iridovírus que infectam animais aquáticos possuem uma distribuição mundial e estão associados a doenças severas. Os girinos têm maior suscetibilidade podendo sofrer mortalidade de até 100% da população. Em ranários da China, ZHANG et al. (2001) isolaram agentes do gênero *Ranavirus* de girinos da espécie *Rana grylio*, as quais apresentavam sinais de doença e mortalidade de até 90%. WENG et al. (2002) relataram a “doença da distensão abdominal” em girinos de criação da espécie *Rana tigrina rugulosa*, também na China. Os autores observaram quadros clínicos com mortalidade de 95%, os quais apresentavam abdome aumentado de tamanho, ataxia e redução da atividade. GREEN et al. (2002), estudando 44 surtos de doenças em anfíbios dos Estados Unidos, incriminaram os iridovírus em 25 casos, sendo 20 deles em girinos e cinco na espécie rã touro.

MAZZONI (2000) no Uruguai, suspeitou da participação de um agente viral pertencente à Família *Iridoviridae*, gênero *Ranavirus*, baseados em quadro clínico semelhante ao descrito por WOLF et al. (1968) para o vírus do edema do girino (TEV). O agente foi detectado em girinos de criação pela técnica de reação em cadeia da polimerase (GALLI et al., 2006) e confirmado como agente etiológico em surtos de alta mortalidade de girinos de até quatro semanas de idade (MAZZONI et al., 2009). Esses resultados corroboram a hipótese da possível etiologia viral para a doença aqui estudada.

Apesar desses achados, os ranavírus foram detectados também em anfíbios sadios (WOLF et al., 1968; ZUPANOVIC et al., 1998; ZHANG et al., 2001; GANTRESS et al., 2003; GREER et al., 2005), sendo que o poder patogênico desses agentes na fase pré-metamórfica da rã touro não está confirmado por enquanto.

Objetivou-se com o presente trabalho descrever um quadro infeccioso em girinos de criação na fase pré-metamórfica e verificar a participação de ranavírus como agente etiológico. Para tanto, foram realizadas pesquisas de agentes etiológicos, epizootologia das doenças, sintomatologia clínica, anatomia patológica macroscópica, histopatologia, bacteriologia convencional e virologia, sendo esta por meio do emprego de técnicas moleculares, e a microscopia

eletrônica de transmissão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 350 girinos na fase pré-metamórfica a partir do estágio 26 (GOSNER, 1960), criados em três ranários localizados no Estado de Goiás, dois localizados no Município de Gameleira e um no Município de Hidrolândia, no período de 2003 a 2005. Todos os ranários utilizavam fontes de água superficial. A água dos tanques era constantemente renovada e a densidade mantida na faixa de um girino por litro de água.

Os girinos eram alimentados com rações fareladas contendo 45% de proteína bruta.

Toda vez que um tanque de criação era esvaziado, drenava-se a água e realizava-se a limpeza e desinfecção final com hipoclorito de sódio em concentração de 10 ppm.

Dados referentes à morbidade e mortalidade foram levantados pelos ranicultores mediante planilhas específicas.

Utilizaram-se 300 girinos de rã touro (*Rana [Lithobates] catesbeiana*) com sinais aparentes da doença e 50 girinos aparentemente saudáveis. Todos os espécimes foram transportados em sacos plásticos contendo água e analisados imediatamente no laboratório do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Selecionaram-se preferencialmente girinos nos estágios iniciais da síndrome, não tendo sido utilizados animais mortos para evitar erros induzidos pelas alterações *post-mortem* (NACE, 1974).

Uma vez sacrificados por concussão craniana e corte da medula cervical (AVMA, 1993), os exemplares foram submersos em solução de ácido peracético a 0,2%. Após a abertura da pele e cavidade celômica, fígado, rins, baço e líquido ascítico foram retirados utilizando-se utensílios esterilizados para cada corte. As amostras foram processadas imediatamente segundo BARON et al., (1996), sendo inoculadas em caldos BHI (*Brain Heart Infusion Broth*), Casoy, (*Tripticase Soy Broth*), Glicose Azida e Selenito-Cistina. Todas as amostras foram incubadas a 30°C por 24-72 h. O período de incubação de 72 h deveu-se à multiplicação lenta de alguns estreptococos, procurando-se, dessa forma, dar tempo suficiente para seu desenvolvimento e, ao mesmo tempo, evitar a ocorrência de falsos negativos. Assim que foi observado o crescimento bacteriano, alíquotas foram semeadas em placas de ágar sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas a 30°C por um período máximo de 72 h, observando-se as características hemolíticas e morfológicas das

unidades formadoras de colônias (UFC). As UFC isoladas e diferentes morfológicamente foram selecionadas para coloração de Gram e observação em microscópio de contraste de fase.

Os cocos Gram-positivos foram estudados mediante provas bioquímicas complementares. As UFC, identificadas primariamente pela bioquímica como estreptococos, foram enviadas para determinação da espécie no *Aquatic Animal Health Research Laboratory* em Auburn - Alabama, nos Estados Unidos. As culturas foram processadas pelo método de identificação de ácidos graxos da membrana, FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*).

Os bastonetes Gram-negativos foram incubados em placas de ágar McConkey e as UFC selecionadas, inoculadas em tubos de TSI (*Triple Sugar Iron Agar*) e submetidas à bateria de testes bioquímicos para identificação da espécie.

Amostras de água e da ração foram analisadas periodicamente por técnicas bacteriológicas convencionais para determinação de contaminação fecal e presença de cocos Gram-positivos (BRASIL, 2003).

Fígado, rins e baço de girinos foram extraídos e preservados em formol tamponado a 10% (vol-vol) e processados segundo a rotina no Laboratório de Histopatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás pelos métodos de LUNA (1968). Os blocos parafinados foram seccionados em cortes de 4-5 µ e corados com hematoxilina-eosina (H&E) para as avaliações primárias das lesões. Adicionalmente, os cortes selecionados foram também corados pelo método de MacCallum-Goodpasture para visualização de bactérias em geral, pelo método de Fite para detecção de micobactérias e coloração de PAS para visualização de fungos.

Fígados, rins, baços e músculo de 50 girinos na pré-metamorfose foram processados. As amostras foram preservadas em etanol a 95% ou congeladas a menos 20°C até processamento no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. A extração do DNA foi realizada a partir de porções de 50 mg utilizando-se o método do fenol/clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989).

Foram utilizados iniciadores direcionados a regiões conservadas no genoma dos iridovírus (Tabela 1). Para o gene que codifica a proteína imediata precoce (IE) ICP-18, utilizaram-se iniciadores propostos por GALLI et al. (2006) e, para o gene que codifica a proteína MCP, foram utilizados iniciadores localizados na extremidade 5' da sequência (MAO et al., 1997), conforme apresentado na Tabela 1.

TABELA 1 – Iniciadores utilizados para amplificação parcial do genoma de ranavírus, “bp” indica o comprimento do *amplicon* em pares de bases

| Nome | Sense | Antisense | Produto (bp) |
|------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
| MCP ¹ | GACTTGGCCACTTATGAC | GTCTCTGGAGAAGAAGAA | 520 |
| IE ² | ATGATCCAAGCCTACCTGTGC | AAATGTCCTAATCTATACACC | 479 |

(1) Proteína maior do capsídeo, MAO et al. (1997); (2) Proteína Imediata precoce ICP-18, GALLI et al. (2006).

O mix utilizado para a amplificação com os diferentes iniciadores constituía-se de 2,5 µL 10x tampão de PCR [Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), KCl 50 mM], dNTP 200 µM, 2,5 mM MgCl₂, 2,5 µM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA Polymerase, 5 µL de DNA template e água MilliQ até completar 50 µL para cada reação. Os produtos de amplificação foram submetidos a corrida em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo 0.5 µg/mL e visualizados em transiluminador de luz UV.

Foram também utilizados iniciadores direcionados à identificação da bactéria *Streptococcus iniae*, aplicando-se a metodologia de PCR proposta por BERRIDGE et al. (1998). Os cocos Gram-positivos, independentemente do gênero, foram purificados, sendo o DNA extraído pela metodologia do fenol/clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989).

As amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão foram processadas no laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico de São Paulo. O material analisado foi selecionado a partir de lesões identificadas nas lâminas da histopatologia. Uma vez delimitada a região suspeita, a mesma foi localizada no bloco parafinado e realizado o corte de aproximadamente 1 mm de diâmetro. O fragmento extraído foi desparafinado, reidratado e finalmente processado pela técnica de inclusão em resina, seguida de contrastação positiva de cortes ultrafinos de acordo com os procedimentos usuais de inclusão em resina, baseando-se nos métodos de LUFT, (1961) e GONZALES-SANTANDER, (1969). Os fragmentos de órgãos foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato 0,2M, pH 7,0, corados por acetato de uranila a 0,5%, desidratados em série cetônica crescente (50 a 100%) e incluídos em resina Spurr. Após ultra seccionamento dos blocos, os cortes foram corados positivamente pelo tratamento sequencial de acetato de uranila (WATSON, 1958) e citrato de chumbo (REINOLDS, 1963), antes de

serem observados ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208.

Estudos da pele e das brânquias foram realizados a fresco, em microscópio ótico, mediante raspagens com lâmina de bisturi esterilizada (REICHENBACH-KLINKE & ELKAN, 1965).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo evidenciaram a existência de uma estreptococose septicêmica que acomete girinos na pré-metamorfose. Observou-se uma síndrome caracterizada por morbidade baixa com alta letalidade, afetando 2 a 3% da população por dia. A doença apresentou-se com maior severidade durante o período de primavera-verão. A prevalência e incidência dos casos foram sempre maiores no ranário de ciclo completo onde o número de animais era também maior. A doença caracterizou-se por apresentar sinais inespecíficos, como letargia e edemas nas patas na fase inicial, e ascite e úlceras na pele nas etapas mais avançadas (FIGURA 1). Às vezes foram observados sinais nervosos como ataxia, natação errática ou em círculos, ou os girinos ficavam flutuando em posição invertida.



FIGURA 1. Girino na fase pré-metamórfica com ascite severa.

À necropsia, os girinos doentes mostraram diversos graus de lesões nos órgãos internos, mas sem padrão definido. As de maior frequência foram aumento do volume e coloração anormal do fígado, geralmente de cor cinzenta ou amarelada, baço aumentado de volume e com coloração pardo-escura e rins hemorrágicos.

Na histopatologia, girinos sem sinais aparentes de doença apresentaram rins com infiltração mononuclear abundante e fígado com diversos graus de esteatose e quantidade variável de granulomas em fases iniciais, com necrose central (FIGURA 2). O número de focos de melanomacrófagos distribuídos no fígado foi muito reduzido e, às vezes, ausente. A coloração de MacCallum-Goodpasture aplicada aos cortes histológicos dos dois órgãos revelou a presença de cocos Gram-positivos.

Os girinos doentes apresentavam lesões por sepsse, caracterizadas por resposta inflamatória múltipla e granulomas bacterianos distribuídos no parênquima dos diversos órgãos, além de áreas de necrose associadas à presença de macrófagos e grande infiltração linfocitária. As lesões no fígado foram mais intensas na região centrolobular do que na região periportal. Observou-se esteatose hepatocitária, com perda da estrutura normal do tecido, associada, por vezes, à necrose. Macrófagos com cocos fagocitados constituíram um achado comum, sendo observada forte relação entre essa resposta e o aparecimento dos granulomas. Estes evidenciaram regiões necróticas circundadas por macrófagos e fibroblastos. Foi evidente a ausência de melanomacrófagos no parênquima do órgão.

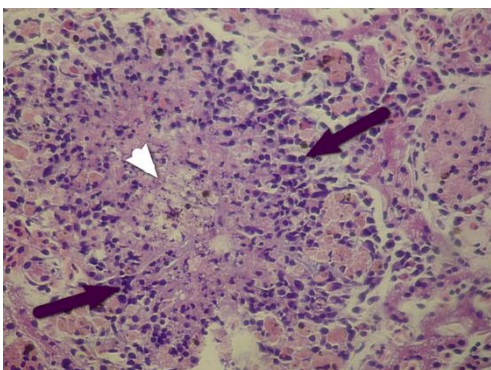


FIGURA 2. Girino sem sinais aparentes de doença. Granuloma no fígado em fase inicial. Observa-se uma área de necrose central (ponta de seta branca) circundada por macrófagos, linfócitos (setas pretas) e fibroblastos. O parênquima hepático evidencia ausência de melanomacrófagos. H&E X200.

Os rins apresentavam infiltração mononuclear às vezes focal e, outras, difusa, necrose glomerular e tubular, congestão e granulomas. Foram

observados glomérulos com espessamento da membrana basal, aumento da celularidade, desaparecimento das alças, retração, atrofia e esclerose (FIGURA 3). Foi possível observar o depósito de material hialino nos glomérulos e abundantes cilindros hialinos nos túbulos. Esse tipo de lesão pode ser classificada como glomerulonefrite membranoproliferativa, evoluindo à esclerose, o que determina síndrome nefrótica seguida por insuficiência renal.

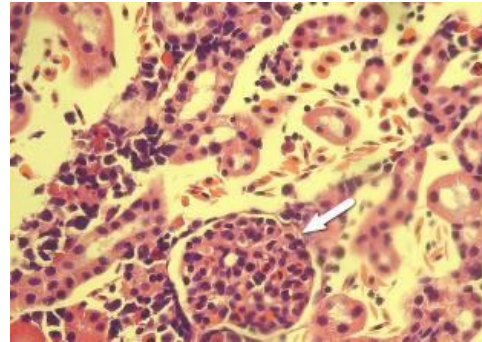


FIGURA 3. Rim de girino com sintomas de edema ascite. Observa-se glomérulo (seta) com espessamento da membrana basal, aumento da celularidade com infiltrado mononuclear abundante e desaparecimento das alças. H&E X400.

O estudo das secções pela coloração de MacCallum-Goodpasture revelou a presença de cocos Gram-positivos em grau variável associados às lesões observadas previamente na coloração H&E. Observaram-se cocos Gram-positivos nos glomérulos e no interstício, demonstrando que os microrganismos são carregados pelo sangue, produzindo lesões e granulomas. O quadro histopatológico é característico das infecções crônicas associadas a bactérias que sobrevivem dentro dos macrófagos após a fagocitose (AGIUS & ROBERTS, 2003). As colorações de PAS e Fite foram negativas para a presença de fungos e micobactérias, respectivamente. Não foram identificados nos tecidos estudados corpúsculos de inclusão viral. Não foram observadas partículas virais nem lesões compatíveis com infecção por esses agentes no material analisado pela microscopia eletrônica.

As análises bacteriológicas apresentaram resultados inespecíficos. Não foi detectada a presença de uma única espécie bacteriana que pudesse ser incriminada como agente causal, mas os achados sempre corresponderam a cultivos mistos. As amostras de água e da ração não evidenciaram contaminação fecal ou presença de cocos Gram-positivos.

Todos os girinos estudados foram positivos para os cocos Gram-positivos dos gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* e *Leuconostoc*, associados a bastonetes Gram-negativos de diversos gêneros, sendo que 60% deles foram positivos para *Aeromonas hydrophila* e *Citrobacter* spp. e 35% para *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp. Dentre os cocos Gram-positivos, foram identificados principalmente *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*, *S. faecalis*, *S. dysgalactiae*, e *Enterococcus* spp. Em todos os casos, os órgãos afetados com maior frequência foram o fígado, seguido pelo rim.

Unidades formadoras de colônias não tipificadas no laboratório foram identificadas pelo FAME como *Enterococcus gallinarum*, *E. columbae*, *E. casseliflavus*, *Leuconostoc* spp. e *Aerococcus viridians*.

Apesar do isolamento nas análises bacteriológicas de um variado tipo de microrganismos, foi constante a presença de cocos Gram-positivos. À histopatologia, as quantidades elevadas dessas bactérias dentro do parênquima dos órgãos indicaram o papel fundamental das mesmas no quadro. É importante ressaltar que esses microrganismos foram observados nos estágios prévios da doença, em amostras obtidas de girinos sem sinais evidentes, indicando que não pertencem aos invasores oportunistas. Os estreptococos potencialmente patogênicos podem ser albergados de forma assintomática por animais e humanos sadios, sendo controlados usualmente pelas defesas não específicas. A ação de fatores desencadeantes, a queda na imunidade, ou mudanças na virulência determinam o aparecimento dos sinais clínicos (MITCHELL, 2003; IICAB, 2005).

Esses achados sugerem que a patogênese do quadro é de uma lesão estreptocócica, não sendo possível, nas condições deste estudo, determinar a causa primária que antecedeu a invasão dos tecidos pelos estreptococos. Do equilíbrio entre a resposta imune, a quantidade e características dos microrganismos presentes e o grau de lesão pré-existente nos diversos tecidos, surge a severidade da doença nesse período específico.

Análises microbiológicas realizados em rãs de criação obtiveram resultados semelhantes aos do presente trabalho (GLORIOSO et al., 1974; AMBORSKI et al., 1983), indicando que esse tipo de infecções múltiplas é comum nesses animais. Da mesma forma, septicemias por estreptococos ocorrem de forma esporádica ou epizootica em populações selvagens ou de criação em grande número de espécies aquáticas, constituindo um problema severo (ROMALDE et al., 2000; TORANZO et al., 2005).

As septicemias têm sido reportadas como a causa mais importante de mortalidade em anfíbios, sendo frequente o achado de animais mortos sem sintomas premonitórios. Os microrganismos do meio ambiente podem tornar-se patogênicos quando os anfíbios são submetidos a condições de estresse, sendo que a sintomatologia observada não depende do tipo de microrganismo envolvido (CRAWSHAW, 1994; GREEN et al., 2002; MAUEL et al., 2002; PASTERIS et al., 2006). Os resultados desta pesquisa corroboram com essas observações. A metamorfose constitui um período de acentuado estresse, portanto, parece lógico pensar que girinos debilitados podem adoecer ao longo do processo. A qualidade das rações oferecidas aos girinos, com elevado conteúdo em carboidratos e proteínas, pode, sem dúvidas, constituir-se na origem de alterações que levam à degeneração gordurosa do fígado, impedimento ou diminuição de suas funções metabólicas e sobrecarga dos rins que acabam sendo lesados. Esse tipo de síndrome hepato-renal é descrita, detalhadamente, na bibliografia científica em outras espécies, fundamentalmente em humanos (ROBBINS et al., 1996; GUINÉS, 2001). A sintomatologia predominante de edemas e ascites associada à presença de lesões importantes nos rins e fígado estão em concordância com essa doença. De igual forma, os sintomas nervosos observados na fase aguda da doença podem ter origem no quadro de encefalopatia hepática (COTRAN et al., 1994), no qual as toxinas não eliminadas pelo fígado chegam ao sistema nervoso central.

Girinos evidenciando edema e ascite foram negativos em 90% dos casos para os iniciadores direcionados a sequências conservadas dos ranavírus. As amostras positivas foram obtidas a partir de girinos sobreviventes de lotes afetados previamente pela virose nas primeiras semanas de vida. Não foi detectado *S. iniae* com os iniciadores utilizados.

Os estudos parasitológicos revelaram a presença de parasitas da pele cujas lesões recebem o nome genérico de “opacidade contagiosa da pele”, cujo protozoário mais frequentemente encontrado foi o *Oodinium* sp. A presença desses agentes pode ser considerada uma consequência do estado geral dos anfíbios, sendo secundária às infecções descritas acima.

CONCLUSÃO

Foi observada a existência de uma estreptococose septicêmica secundária que acomete girinos na pré-metamorfose. Apesar do caráter secundário da infecção, o papel dos cocos Gram-

positivos não pode ficar sem estimativa nas doenças dos girinos na fase pré-metamórfica e, portanto, devem ser levados em conta nos planos de controle sanitário dos ranários comerciais.

O papel dos ranavírus nesses girinos não foi demonstrado, sugerindo uma menor susceptibilidade nesse período de desenvolvimento dos girinos de *Rana [Lithobates] catesbeiana*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Phil Klesius pelo processamento e identificação de amostras bacterianas. O trabalho foi realizado com apoio da CAPES.

REFERÊNCIAS

- A.V.M.A. 1993 Report of the A.V.M.A. Panel for euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, n.2, p. 229-249, 1993.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**. Oxford, n. 26, p. 499-509, 2003.
- AMBORSKI, R. L.; SNIDER, T. G.; THUNE, R. L.; CULLEY, D. D. A non-hemolytic, group B *Streptococcus* infection of cultured bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**. Ames-IO, v.19, n. 3, p. 180-184, 1983.
- BARON, E. J.; PETERSON, L.R.; FINEGOLD, S. M. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 9th Ed. Mosby-Year Book Inc. St. Louis, 1996.
- BERCOVIER, H., GHITTINO C.; ELDAR A. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. **Developments in Biological Standardizations**, Switzerland, v. 90, p. 153-160, 1997.
- BERRIDGE, B. R.; FULLER, J. D.; DE AZAVEDO, J.; LOW, D. E.; BERCOVIER, H.; FRELIER, P. F. Development of specific nested oligonucleotide PCR primers for the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington-VA, v. 36, n. 9, p. 2778-2781, 1998.
- BONDAD-REANTASO, M. G.; SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR J. R.; OGAWA, K.; CHINABUT, S.; ADLARD, R.; TAN, Z.; SHARIFF, M. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**. v. 132, p. 249-272, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 set., 2003. Seção I, p.14-50.
- CDC. Invasive infection with *Streptococcus iniae* – Ontario, 1995-1996. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. Atlanta-GA, v. 45, n. 30, p. 650-652, 1996.
- COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS. S. **Robbins - Pathologic basis of disease**. 5 ed. Philadelphia, Saunders Company, 1994. 1400p.
- CRAWSHAW, G. **Medicina de anfíbios**. In: Terapêutica veterinária de pequenos animais. KIRK, R. W. & BONAGURA, J.D. Eds. Interamericana-Mc Graw Hill. México, 1994, p. 1355-1369.
- DURBOROW, R. M. Health and safety concerns in fisheries and aquaculture. **Occupational medicine**. Philadelphia-PA, v. 14, n. 2, p. 373-406, 1999.
- ELDAR, A.; HOROVITCZ, A.; BERCOVIER, H. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. Amsterdam, v. 56, p. 175-183, 1997.
- FULLER, J. D.; BAST, D. J.; NIZET, V.; LOW, D. E. ; DE AZAVEDO, J. C. *Streptococcus iniae* virulence is associated with a distinct genetic profile. **Infection and immunity**. Bethesda-MD, v. 69, n. 4, p. 1994-2000, 2001.
- GALLI, L.; PEREIRA. A. ; MARQUEZ, A.; MAZZONI, R. Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw 1802) from South America. **Aquaculture**, Amsterdam, v., 257, n. 1-4, p. 78-82, 2006.
- GANTRESS, J.; MANIERO, G.; COHEN, N.; ROBERT, J. Development and characterization of a model system to study amphibian immune responses to iridoviruses. **Virology**, New York-NY, v. 311, n. 2, p. 254-262, 2003.
- GLORIOSO, J. C.; AMBORSKI, R. L.; AMBORSKI, G. F.; CULLEY, D. D. Microbiological studies on septicaemic bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **American Journal of Veterinary Research**. Chicago-IL, v. 35, n. 9, p. 1241-1245, 1974.
- GONZALES-SANTANDER, R. Técnicas de microscopia eletrônica en biología. Madrid, Aguilar, 1969, 666 p.
- GOSNER, K. A simplified table for staging anuran embryos and larva with notes on identification. **Herpetologica**, Austin-TX, v. 16, p. 183-190, 1960.
- GREEN. D.; CONVERSE, K.; SCHRADER, A. Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996-2001. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 969, p. 323-339, 2002.
- GREENLEES, K. J.; MACHADO, J.; BELL, T.; SUNDLOF, S. F. Food borne microbial pathogens of cultured aquatic species. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**. Philadelphia-PA, v. 14, n. 1, p. 101-112, 1998.
- GREER, A.; BERRILL, M.; WILSON, P. Five amphibian

- mortality events associated with ranavirus infection in south central Ontario, Canada. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 67, p. 9-14, 2005.
- GUINÉS, P. **Síndrome hepato-renal** [on line]. In: ASOCIACION ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HIGADO. 2001 p. 129-138 Disponível em: http://www.aeeh.org/trat_enf_hepaticas/C-13.pdf Acesso em: 29 mar 2006.
- HIPÓLITO, M.; BACH, E.E. Patologias em rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw 1802). Primeira revisão da bibliografia brasileira. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**. São Paulo, v. 69, n. 2, p. 113-120, 2002.
- IICAB . Desenvolvida pela Iowa State University-AOIEC Center - Institute for International Cooperation in Animal Biologies. An OIE Collaborating Center, 2005. Apresenta textos sobre doenças infecciosas nos animais e riscos na saúde pública. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu> Acesso em 23 nov. 2005.
- LAU, S. K.; WOO, P. C.; TSE, H.; LEUNG, K. W.; WONG, S. S.; YUEN, K. Y. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington-VA, v. 41, n. 3, p. 1004-1009, 2003.
- LEHANE, L.; RAWLIN, G. T. Topically acquired bacterial zoonoses from fish: a review. **The Medical Journal of Australia**. Sydney, v. 173, n. 5, p. 256-259, 2000.
- LUFT, J. A. Improvements in an epoxy resin embedding methods. **Journal of Biophysics, Biochemistry and Cytology**, v. 9, p. 409-414, 1961.
- LUNA, L.G. **Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. New York : McGraw-Hill, 1968. 258p.
- MAO, J.; HEDRICK, R.; CHINCAR, V. Molecular characterization, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. **Virology**, New York-NY, n. 229, p. 212-220, 1997
- MATHIAS, M.; SCOTT, P. **Potencial produtivo de criação de rãs no Estado do Rio de Janeiro**. Série Agronegócios, SEBRAE/RJ, 100p., 2004.
- MAUEL, M.; MILLER, K; FRAZIER, K; HINES, M. Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrogs (*Rana catesbeiana*). **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigations**. Columbia-MO, v. 14, n. 5, p. 431-433, 2002.
- MAZZONI, R. Diseases in farmed American bull frog (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) in Uruguay. In: GETTING THE JUMP! ON AMPHIBIAN DISEASE, 2000, Cairns, Austrália. <http://www.jcu.edu.au/school/phtm/PHTM/frogs/mazzoni.ppt>, 2000
- MAZZONI, R.; MESQUITA, A.; FLEURY, L.F.; BRITO, W.M.D.; NUNES, I.A.; ROBERT, J.; MORALES, J.; BARTHASSON, D.; GALLI, L.; CATROXO, M. H.B. Mass mortality associated with Ranavirus infection in farmed tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 86, n. 3, p. 181-191, 2009.
- MITCHELL, T. The pathogenesis of streptococcal infections: From tooth decay to meningitis. **Nature Reviews. Microbiology**. London, v. 1., p. 219-230, 2003.
- NACE, G. (ed.): **Amphibians**: Guidelines for the breeding, care and management of laboratory animals. Washington D.C., NRC/NAS, 1974, 153p. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/661.html#toc> , Acesso em: 15 fev 2004.
- PASTERIS, S.; BUHLER, M.; NADER-MACIAS, M. Microbiological and histological studies of farmed-bullfrog (*Rana catesbeiana*) tissues displaying red-leg syndrome. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 251, n. 1, p. 11-18, 2006.
- REICHENBACH-KLINKE, H.; ELKAN, E. **The principal diseases of lower vertebrates**, New York, Academic Press, 600 pp., 1965.
- REINOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.
- ROBBINS, S.; COTRAN, R.; KUMAR, V. **Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 605.
- ROMALDE, J.; LORES, F.; MAGARIÑOS, B.; BARJA, J.; TORANZO, A. Study of cell surface associated virulence factors of *Streptococcus parauberis* strains pathogenic for turbot. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**. The Netherlands, v. 20, n. 6, p. 244-251, 2000.
- ROTTMANN, R.; FRANCIS-FLOYD, R.; DURBOROW, R. The role of stress in fish disease. **South Regional Aquaculture Center Publication** [online] n. 474, 1992. Disponível em: http://aquanic.org/publicat/usda_rac/efs/srac/474fs.pdf Acesso em: 15 mar. 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: A laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v. 3104p.
- TORANZO A.E., MAGARIÑOS B.; ROMALDE J.L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 246, p. 37-61, 2005.
- WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysics, Biochemistry and Cytology**, v. 4, p. 75-478, 1958.
- WEINSTEIN, M. R.; LITT, M.; KERTESZ, D. A.; WYPER, P.; ROSE, D.; COULTER, M.; MCGEER, A.; FACKLAM, R.; OSTACH, C.; WILLEY, B. M.; BORCZYK, A.; LOW, D. E. nvasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. S. iniae Study Group. **The New England Journal of Medicine**. Boston-MS, v. 337, n. 9, p. 589-594, 1997.

WENG, S.; WANG, Y.; HE, J.; DENG, M.; LU, L.; GUAN, H.; LIU, Y.; CHAN, S. Outbreaks of an iridovirus in red drum, *Sciaenops ocellata* (L.), cultured in southern China. **Journal of Fish Diseases**. Oxford, v. 25, n. 11, p. 681-685, 2002.

WOLF, K.; BULLOCK, G.; DUNBAR, C.; QUIMBY, M. Tadpole edema virus: a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago-IL, v. 118, n. 3, p.253-262,1968.

ZHANG, Q.; XIAO, F.; LI, Z.; GUI, J.; MAO, J.;

CHINCHAR, V. Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog *Rana grylio* with lethal syndrome. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 48, n. 1, p. 27-36, 2001.

ZUPANOVIC, Z.; LOPEZ, G.; HYATT, A.; GREEN, B.; BARTRAN, G.; PARKES, H.; WHITTINGTON, R.; SPEARE, R. Giant toads *Bufo marinus* in Australia and Venezuela have antibodies against "ranaviruses. **Diseases of Aquatic Organisms**, Amelinghausen, v. 33, p. 1-8,1998.

Protocolado em: 08 abr. de 2008 Aceito em:27 jan. 2012.