

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E CLÍNICA DE SURTOS DE “RED LEG” EM MINAS GERAIS E AVALIAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA *IN VITRO* DO VANTOCIL IB® PARA *Aeromonas hydrophila*

MICROBIOLOGICAL AND CLINICAL CHARACTERIZATION OF “RED LEG” OUTBREAKS IN MINAS GERAIS, BRAZIL, AND EVALUATION OF *IN VITRO* BACTERIAL EFFECTS OF VANTOCIL IB® FOR *Aeromonas hydrophila*

Anna Christina de Almeida¹ Luiz Eduardo Ristow² Tânia de Toledo Martins Buelta³

RESUMO

Com o objetivo da caracterização da ocorrência de “red leg” em Minas Gerais, avaliaram-se rãs jovens e adultas que apresentavam úlceras nas patas e dedos, derrame hemorrágico na pele da região ventral, incoordenação motora, altas taxas de mortalidade em adultos e abscessos hepáticos à necropsia. No cultivo de fragmentos de pele lesada e abscessos, foi isolado e identificado *Aeromonas hydrophila*. O efeito bactericida do VANTOCIL IB® foi superior ao permanganato de potássio, determinado pela concentração inibitória mínima para colônias isoladas.

Palavras-chave: rãs, “red leg”, *Aeromonas hydrophila*, vantocil, biguanida.

SUMMARY

With the objective of characterizing the occurrence of “red leg” in Minas Gerais, Brazil, young and adult frogs which presented in their pads and limbs hemorrhage in the skin of the ventral region, incoordination, high death rate in adults and hepatic abscess at necropsy, have been evaluated. In fragment culture of damage skin and abscess, *Aeromonas hydrophila* has been isolated and identified. The bactericidal effect of VANTOCIL IB® was higher than that of potassium permanganate, as determined by the minimal inhibitory concentration for isolated colonies.

Key words: frogs, “red leg”, *Aeromonas hydrophila*, vantocil, biguanides.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *A. hydrophila* são habitantes normais de ambientes aquáticos e compõem a microbiota regular de animais ectotermos e endotermos (KAY *et al.*, 1985, SUGITA *et al.*, 1995), sendo considerada por vários autores como patógeno emergente de veiculação alimentar (ROSSI *et al.*, 1996). Sob condições estressantes de manejo, *A. hydrophila* pode causar doenças com altas mortalidades em animais ectotermos (SOVERI, 1981, YADAV *et al.*, 1996), mamíferos (LOVE & LOVE, 1981, FEGURA & MARRI, 1985, KAY *et al.*, 1985) e aves (SHANE & GIFFORD, 1985, SHANE *et al.*, 1988).

Em rãs, essa bactéria é responsável por “red leg”, enfermidade associada a más condições de higiene dos tanques e má qualidade da água (HIPÓLITO, 1995). Caracteriza-se por úlceras nas patas, mandíbulas, dedos e pele; derrame hemorrágico na região ventral e patas; mortalidades em taxas variadas, problemas locomotores e abscessos hepáticos podem estar presentes (RAFIDAH *et al.*, 1990, HIPÓLITO, 1995). Infecções em humanos são apresentadas por intoxicação alimentar devido à ingestão de produtos

¹Médico Veterinário, Doutor, Professor do Instituto de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Universidade de Alfenas – UNIFENAS/ICAMY, Rodovia MG 170, km 0, Campus Universitário, 37130-00, Alfenas, MG. Fone (35) 299-3165. E-mail: chris@unifenas.br. Autor para correspondência.

²Médico Veterinário. Diretor técnico do Teca Laboratórios.

³Estudante de graduação, Curso de Medicina Veterinária, UNIFENAS.

de origem animal (BUCHANAN & PALUMBO, 1985, HANNIENEN, 1993, YADAV *et al.*, 1996, ROSSI *et al.*, 1996) e/ou água contaminada (BERNAGOZZI *et al.*, 1997, WABURTON *et al.*, 1995), com mortalidade elevada, gastroenterite e septicemia, ou como agente oportunista em infecções de feridas, meningites, osteomielites, infecções urinárias, respiratórias e oculares, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (QUINN *et al.*, 1994).

No Brasil, a literatura sobre infecções por esse agente é escassa, sendo descrita apenas a ocorrência da bactéria em carne bovina comercializada no Estado de São Paulo (ROSSI *et al.*, 1996) e em peixes no Estado de Minas Gerais (HOLANDA *et al.*, 1998). A ocorrência em ranicultura, de acordo com relatos pessoais de produtores, está sendo cada vez mais frequente e o diagnóstico é feito somente em caráter clínico.

Para tratamento da enfermidade, é indicado antibioticoterapia à base de gentamicina, sulfametoxazol, cefalosporina e cloranfenicol (QUINN *et al.*, 1994). Em ranicultura, além da retirada de fatores predisponentes, a indicação terapêutica é feita com antibioticoterapia ou imersão dos animais afetados em solução de permanganato de potássio a 10% ou sulfato de cobre 5% (Frog Doctor, 1997).

A utilização de antibióticos é prática difícil pela necessidade de formulações adequadas e pelo custo. A imersão em permanganato de potássio leva à perda total da pele e, em sulfato de cobre, deixa a carne escura, tomando-a inviável para consumo, se realizado próximo ao abate, o que dificulta o controle e tratamento da enfermidade, necessitando então do desenvolvimento de produtos eficientes que sejam aplicáveis economicamente.

O VANTOCIL IB® (sal de biguanida polimérica) é um biocida que tem se apresentado com características desejáveis para utilização em criações de animais, pois tem baixo poder residual em água e alimentos, reduzida toxicidade para peixes e outros microorganismos vivos em águas residuais tratadas, baixa irritabilidade para superfícies mucosas e boa ação fungistática e bactericida, sendo descrita sua utilização em avicultura (INFORMÁTICO ICI, 1997). O produto vem sendo utilizado em ranicultura sem que seja avaliada a eficiência do mesmo em qualquer parâmetro.

Este trabalho descreve a ocorrência de "red leg" em Minas Gerais, com caracterização clínica e laboratorial da enfermidade e avalia o efeito bactericida do VANTOCIL IB® sobre *A. hydrophila in vitro* como ensaio prévio para otimização de sua utilização em ranicultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Quinze rãs adultas e dez jovens provenientes de duas anfigranjas localizadas no Estado de Minas Gerais, com suspeita clínica de "red leg" foram enviadas ao TECSA Laboratórios, Belo Horizonte, MG, para diagnóstico da enfermidade. Avaliaram-se os sinais clínicos e lesões à necropsia (RAFIDAH *et al.*, 1990, HIPÓLITO, 1995) e procedeu-se análise microbiológica.

O isolamento foi realizado a partir de macerados de fragmentos de pele e fígado lesados em ágar sangue-dextrina-ampicilina a 28°C por 24 horas (HAVELAR & VONK, 1988) e posterior identificação de colônias sugestivas através de provas bioquímicas e morfológicas (KONEMAN *et al.*, 1994, QUINN *et al.*, 1994).

Para ensaio, verificando a eficiência do VANTOCIL IB® - ZENECA, as colônias identificadas foram submetidas determinação da Concentração Inibitória Mínima MIC (NATIONAL..., 1994) em paralelo ao permanganato de potássio, com modificações. Para realização da leitura inoculou-se 0,1ml de cada diluição em ágar sangue-dextrinaampicilina, conforme realizado para isolamento inicial, sendo verificada a presença de crescimento de colônias características, pois a diluição do produto no meio sem crescimento já o tomava turvo, o que poderia interferir na leitura final.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas duas propriedades avaliadas foi descrito mortalidade em todas as fases de criação, com taxas variáveis de 10 a 80%, concentrando na fase de terminação. À análise clínica e macroscópica das lesões, observaram-se úlceras nas patas (90%) e dedos (92%), derrame hemorrágico na região ventral (80%), dificuldade de locomoção (60%) e abscessos hepáticos (56%). Estes achados são compatíveis com os descritos na literatura que caracterizam clínica e patologicamente "red leg" (RAFIDAH *et al.*, 1990, HIPÓLITO, 1995).

O crescimento de colônias características em ágar sangue-dextrina-ampicilina e ágar MacConkey, avaliadas em características morfotintoriais e submetidas a provas fisiológicas e bioquímicas (Tabela 1) apresentaram-se compatíveis com os descritos na literatura (KONEMAN *et al.*, 1994, QUINN *et al.*, 1994), permitindo a identificação de *A. hydrophila*.

O isolamento e identificação de *A. hydrophila* em Minas Gerais, neste trabalho, (Tabela 1) mostra que o diagnóstico laboratorial da

Tabela 1 – Características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas de *A. hydrophila* isolada em surto de "red leg" em Minas Gerais.

| Característica avaliada | Resultados observados |
|-------------------------------|---|
| Características morfológicas | Bastonetes gram negativos, tamanho médio, pleomórficos de lados retos |
| Beta hemólise em sangue ovino | Presente |
| Oxidase | Positiva |
| Catalase | Positiva |
| Mobilidade | Positiva |
| DNAse | Positiva |
| Índol | Positiva |
| Produção de gás (glicose) | Positiva |
| Descarboxilases: | |
| Lisina | Negativa |
| Ornitina | Negativa |
| Arginina | Positiva |
| Esculina | Positiva |
| Fermentação: | |
| Arabinose | Positiva |
| Sacarose | Positiva |
| Manitol | Positiva |
| Inositol | Negativa |

enfermidade em ranários pode ser realizado de forma relativamente simples, rápida e barata, permitindo o reconhecimento da enfermidade, o que facilitaria o direcionamento das medidas de controle a serem implantadas, reduzindo perdas na produtividade dos animais.

Ao se tratarem de animais ectotermos frios fica difícil de estabelecer com exatidão os responsáveis diretos pelas enfermidades, pelo fato de, normalmente, serem agentes microbianos pertencentes à microbiota natural do animal estando no ambiente aquático, e, também por serem oportunistas e ubiqüitários (HIPÓLITO, 1994). As enfermidades ocorrem em certas condições ainda não bem estabelecidas, sendo o estresse um fator predisponente constante, além da participação de outros agentes físicos, químicos e biológicos (HIPÓLITO, 1995), sendo necessária a determinação destes para controle de enfermidades.

Na determinação da MIC, os resultados para o VANTOCIL IB® foram em diluições superiores aos do permanganato de potássio, isto é, até a diluição 10^{-3} M do produto, este ainda apresentava atividade bactericida (Tabela 2). O tratamento de enfermidades em rancultura, como em qualquer exploração pecuária deste nível, acarreta custos com medicamentos, mudanças na rotina do ranário, presença de resíduos na água e

Tabela 2 – Determinação da concentração inibitória mínima do VANTOCIL IB® e permanganato de potássio para *A. hydrophila* isolada de surtos de "red leg" em Minas Gerais.

| Produto | Diluições | | | | |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} |
| VANTOCIL IB® | Neg* | Neg | Neg | Pos** | Pos |
| Permanganato de potássio | Neg | Pos | Pos | Pos | Pos |

* Ausência de crescimento bacteriano.

** Presença de crescimento bacteriano.

carne, custos excessivos, necessidade de via de administração que facilite o manejo, além de que, no caso específico de "red leg", toma a carne imprópria para o consumo (HIPÓLITO, 1995). A utilização de VANTOCIL IB®, pelos resultados aqui apresentados, pode vir a ser um produto que supra algumas das deficiências encontradas em produtos bactericidas.

Torna-se necessária a avaliação dos efeitos do produto *in vivo* para rancultura, considerando a natureza dessa exploração, pois as excretas dos animais ajudam a manter o índice de microrganismos no ambiente, como também o custo/benefícios em relação aos tratamentos até então preconizados.

AGRADECIMENTOS

Tecsa Laboratórios. Zeneca Biocidas.
Zeneca Biocidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNAGOZZI, M., BIANUCCI, M. SACHETTI, R. Prevalence of *Aeromonas* spp. to surface waters. **Water Environment Research**, v.67, n.7, p.1060-1064,1997.
- BUCHANAN, R.L., PALUMBO, S.A. *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* as potential food poisoning species: a review. **Journal of Food Safety**, v.7, n.1, p.15-29,1985.
- FROG DOCTOR- Informação via totemet-
<http://www.teleport.com/~dstroy/info/sick.html>. 1997.
- FEGURA, A., MARRI, L. Isolation of *Aeromonas* sp. From animaes [swine] **European Journal of Clinical Microbiology**, v.4, n.3, p.354-355, 1985.
- HANNIENEM, M.L. Occurrence of *Aeromonas* sp. in samples of ground meat chicken. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, n.4, p.339-392,1993.
- HAVELAR, A.H., VONK, M. The preparation of ampicilin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in Maltor. **Letters in Applied Microbiology**, v.7, p.167-171, 1988.

- HIPÓLITO, M. Patologia e manejo sanitário dos organismos aquáticos. **ABC - Rã**, v.1, n.5, p.1-2,1994.
- HIPÓLITO, M. Manejo sanitário to: **TECHNOFROG**, 95, 1995, Viçosa. **Anais...** Viçosa: 1995. v.II. p. 199-207.
- HOLANDA, E.D., LIMA, E.C., MARTINS, N.E., *et al* Ocorrência de *Aeromonas* sp em Tilápias (*Oreochromis* spp). Belo Horizonte, MG, 1998. to: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA, UFMG, 16, 1998, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Napq. 1998. 208p. p.70.
- INFORMATIVO TÉCNICO ICI. **VANTOCIL IB®** • São Paulo, ICI, 1997. 40p.
- KAY, B.A., GUERRERO, C.E., SACK, R.B. Media for isolation of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.22, n.5, p.888-890,1985.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., *et al* **Introduction to diagnostic microbiology**. Philadelphia: Lippincott, 1994. 527p.
- LOVE, R.J., LOVE, D.N. *Aeromonas hydrophila* isolated from polyarthritis in a calf. **Australian Veterinary Journal**, v.61, n.2, p.65,1981
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS 3rd ed. Vilanova: NCCLS,M7-A3, 1994.. 28p.
- QUINN, P.Q., CARTER, M.E., MARKEY, B., *et al*. **Clinical veterinary microbiology**. 4 ed. London: Wolfe, 1994. 648p.
- RAFIDAH, J. ONG, B.L. SAROJA, S.J. Outbreak of "red leg" in *Aeromonas hydrophila* infection in frogs. **Journal Veterinary, Malaysia**, v.2, n.2, p.139-142,1990.
- ROSSI, O.D.JR., FILHO, A.N., AMARAL, L.A. Ocorrência of *Aeromonas* species in commercial cattle meat in Jaboticabal, São Paulo, Brazil, and a comparison study of isolation media. **Ars Veterinária**, v.12, n.1, p.69-73,1996.
- SHANE, S.M., GIFFORD, D.H. Prevalence and pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. **Avian Diseases**, v.29, n.3, p.681-689, 1985.
- SHANE, S.M., HARRINGTON, K.S., MONTROSE, M.S., *et al* The occurrence of *Aeromonas hydrophila* in avian diagnostic submission. **Avian Diseases**. v.28, n.3, p.804-807,1988.
- SOVERI, T. Observations of bacterial diseases of captive snakes in Finlandia. **Nordisk Veterinaermedicin**, v.36, n. 1/2, p.38-42,1981.
- SUGITA, H., TANAKA, K., YOSHIMANI, M., *et al* Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, n.1 1, p.4128-4230,1995.
- WABURTON, D.W., McCORMICK, J.K., BOWEN, B. Survival and recovery of *A. hydrophila* in water: development of methodology for testing blotted water in Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, v.4, n.2, p.145-148, 1995.
- YADAV, A.S., SINGH, B.R., KAPOOR, K.N., *et al*. Isolation of iatrogenic *Aeromonas* from fish **Indian Journal of Veterinary Research**. v.5, n.1, p.45-48,1996.