

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

VINÍCIUS VIEIRA DE PAIVA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR *Streptococcus agalactiae*
EM RÃS-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)

UBERLÂNDIA-MG

2021

VINÍCIUS VIEIRA DE PAIVA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR *Streptococcus agalactiae* EM RÃS-
TOURO (*Lithobates catesbeianus*)

Trabalho de Dissertação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Investigação etiológica

Orientador: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Augusto de Alcântara Costa

UBERLÂNDIA-MG

2021

P149 Paiva, Vinícius Vieira de, 1993-
2021 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR
Streptococcus agalactiae EM RÃS-TOURO (*Lithobates*
catesbeianus) [recurso eletrônico] / Vinícius Vieira de
Paiva. - 2021.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima.

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Augusto de Alcântara
Costa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.551>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Lima, Profa. Dra. Anna Monteiro
Correia, 1973-, (Orient.). II. Costa, Prof. Dr. Frederico
Augusto de Alcântara, 1984-, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em
Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

| | | | | | |
|------------------------------------|---|-----------------|-------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em: | CIÊNCIAS VETERINÁRIAS | | | | |
| Defesa de: | DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO Nº PPGCVET/ 007/2021 | | | | |
| Data: | 28 de setembro de 2021 | Hora de início: | 10:00 | Hora de encerramento: | 12:00 |
| Matrícula do Discente: | 11912MEV013 | | | | |
| Nome do Discente: | VINÍCIUS VIEIRA DE PAIVA | | | | |
| Título do Trabalho: | Identificação e caracterização da infecção por <i>Streptococcus agalactiae</i> em rãs-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) | | | | |
| Área de concentração: | Saúde Animal | | | | |
| Linha de pesquisa: | Investigação Etiológica | | | | |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | Estudos de epidemiologia, de novas técnicas de diagnóstico e prevenção de doenças bacterianas em animais domésticos e selvagens | | | | |

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico), da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Marcus Vinícius Coutinho Cossi - UFU; Guilherme Campos Tavares - UFMG; Frederico Augusto de Alcântara Costa** Co-orientador do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. Frederico Augusto de Alcântara Costa Co-orientador, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimeira a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Augusto de Alcântara Costa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/09/2021, às 12:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcus Vinicius Coutinho Cossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/09/2021, às 14:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **GUILHERME CAMPOS TAVARES, Usuário Externo**, em 28/09/2021, às 14:42, conforme



horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3061887** e o código CRC **D4E4F717**.

Dedico este trabalho aos meus pais, Elenice e Gismar, bem como a minha irmã Lorena, que me oferecem apoio incondicional em meus projetos e na minha vida, e são meus companheiros na constante busca por sermos seres humanos melhores.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1 - | Bullfrog inundated system at SEAQUI-UFU | 29 |
| Figura 2 - | Bullfrog. A- Lateral curvature of spine. B-Ascitis. C-Rostral skin lesion. D-Haemorrhagic lesions in legs, torax and abdome. | 33 |
| Figura 3 - | Photomicrograph of Brain fragment with the presence of mononuclear inflammatory cells in the meninges, characterizing meningitis. | 34 |
| Figura 4 - | Photomicrograph of brain. There was an increase in glial cells randomly by the fragment, and multifocal areas of hemorrhage. Increased Virschow space, characterizing edema | 34 |
| Figura 5 - | Photomicrograph of.Fragment of liver showing enlarged hepatocytes, with peripheral nucleus and cloudy cytoplasm, with indistinct cytoplasmic limits , compatible with edema. Presence of melanomacrophages in moderate to marked amounts(A). Photomicrograph of Heart fragment with a marked increase in the spacing between cardiac fibers, characterizing edema. Presence of mononuclear inflammatory cells in a marked amount in the pericardium region and a rare amount of intermingling with cardiac fibers. We noticed a vascular structure containing adhered to the wall, in tunica intima, a structure consisting of cell debris, fibrin and basophilic granular structures suggestive of bacterial colonies, characterizing thrombus(B). | 35 |

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares por todo cuidado, em especial Vó Dorinha e Margarida e Vô Gilberto por serem a base de tudo.

A Amanda por ter sido minha parceira em todo o período de mestrado.

Aos amigos por trazerem mais alegria a minha vida, em especial meu companheiro de escritório Luiz (cabeça) e os parceiros do MEVCAST, João Paulo, João Pedro e Filipe.

A todos os colaboradores, professores e discentes UFU em especial aos amigos do LADOC.

Ao CAUNESP-UNESP-Jaboticabal pelo acolhimento como aluno especial e pelo conhecimento compartilhado.

Ao suporte oferecido pelo AQUACEN-UFMG no processamento de amostras, em especial ao Prof. Guilherme por todo o conhecimento compartilhado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Agradecimento especial à Gabriela, Matheus e Ana Laura, que participaram ativamente do projeto.

A profa. Dra. Anna Lima, que vem me orientando desde a graduação, sempre trazendo muitos ensinamentos

A todos das pisciculturas Udiaqua e Bioacqua, locais onde pude aplicar meus conhecimentos por meio do trabalho, recebendo de volta ensinamentos que foram e estão sendo fundamentais para meu amadurecimento profissional.

Por fim, gostaria de registrar um agradecimento especial ao Prof. Frederico, por todas as oportunidades oferecidas, pela dedicação em ensinar, por toda orientação dentro e fora da universidade e pela parceria em todos projetos que desenvolvemos.

RESUMO

A ricultura no Brasil tem grande importância no cenário mundial, além de ser um dos maiores países criadores, também se destaca pelo nível de tecnificação de sua produção. O cultivo intensivo no país permite uma grande produção em pequenos espaços de confinamento, principalmente quando se faz o uso do sistema alagado, no entanto o risco de proliferação de doenças infecciosas também aumenta consideravelmente. A bactéria *Streptococcus agalactiae* causa surtos com alta mortalidade em diferentes espécies aquáticas, inclusive em tilápias do Nilo, outra espécie de grande importância no cenário brasileiro. Entre os anos de 2018 e 2019 ocorreram surtos no setor de aquicultura da Universidade Federal de Uberlândia, de *Streptococcus agalactiae* com 55% de taxa de mortalidade nos animais em fase final de terminação, o estudo segue com a identificação dos isolados de *Streptococcus agalactiae* e com a caracterização da doença ocorrida nos surtos.

Palavras-chave: Ricultura; Rã-touro; *Streptococcus agalactiae*; MLST

ABSTRACT

Brazilian frog culture shows a big importance in world scenario, in addition to being one of the biggest producers, it also stands out for the level of technification. Intensive cultivation in the country allows a large production in small confined spaces, especially when using the flooded system, however the risk of proliferation of infectious diseases also increases considerably. *Streptococcus agalactiae* causes outbreaks with high mortality in different aquatic species, including Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), another species of great importance in Brazilian scenario. Between 2018 and 2019 many *Streptococcus agalactiae* outbreaks happened on the aquaculture sector of Universidade Federal de Uberlândia, with a 55% mortality rate in animals in the stage of termination, the study continues with the identification of *Streptococcus agalactiae* isolates and with the characterization of the disease that occurred in the outbreaks.

Keywords: Frog culture; bullfrog; *Streptococcus agalactiae*; MLST.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1:-CONSIDERAÇÕES SOBRE A CRIAÇÃO DE RÃS-TOURO

| | |
|---|----|
| <i>(Lithobates catesbeianus)</i> | 12 |
| 1.1 Panorama da produção de rã-touro | 12 |
| 1.2 Fases de produção da rã-touro | 13 |
| 1.1.1 Reprodução | 13 |
| 1.1.2 Girinagem | 14 |
| 1.1.3 Recria e engorda | 15 |
| 1.3 Imunologia | 16 |
| 1.4 Principais doenças infecciosas na ranicultura | 16 |
| 1.4.1 Período pré metamorfose | 16 |
| 1.4.2 Período pós metamorfose | 17 |
| 1.4.3 Epidemiologia molecular do <i>Streptococcus agalactiae</i> | 20 |
| Considerações finais | 22 |
| CAPÍTULO 2: CHARACTERIZATION AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF THE <i>Streptococcus agalactiae</i> INFECTION IN FARMED BULLFROG (<i>Lithobates catesbeianus</i>) IN BRAZIL | 27 |
| 1. INTRODUCTION | 27 |
| 2. MATERIALS AND METHODS | 29 |
| 2.1 Outbreak | 29 |
| 2.2 Samples | 30 |
| 2.3 Isolates | 30 |
| 2.3.1 Capsular serotyping | 30 |
| 2.3.2 MALDI-TOF | 31 |
| 2.3.3 Multilocus Sequence Typing (MLST) | 31 |
| 3.RESULTS | 32 |
| 3.1 Outbreak Characterization | 32 |
| 3.2 MLST | 36 |
| 4.DISCUSSION | 36 |
| 5.CONCLUSION | 38 |
| 6.AKNOWLEDGEMENTS | 38 |
| LITERATURE CITED | 38 |
| ANEXO A – NORMAS DO CAPITULO 2 | 42 |

CAPÍTULO 1-:CONSIDERAÇÕES SOBRE A CRIAÇÃO DE RÃS-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)

1.1 Panorama da produção de rã-touro

A espécie Rã-touro *Lithobates catesbeianus*, Shaw, 1802, proveniente da América do Norte, é encontrada também em países da Europa, Ásia, América Central e América do Sul, como uma espécie exótica. É uma das maiores espécies do gênero *Lithobates*, chegando a pesar em média 800g na fase adulta e 20 cm de comprimento. (IUCN-SSC-AMPHIBIAN-SPECIALIST-GROUP, 2015; FAO, 2021). A Rã-touro apresenta facilidade em se adaptar ao manejo, e possui um bom desempenho produtivo, o que favorece a sua criação como uma atividade zootécnica e econômica (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

O consumo de carne de rã pode ser observado em diferentes culturas ao longo dos anos, inclusive possui relatos que remetem a séculos antes de Cristo. A partir da década de 1970, Cuba começa a explorar o comércio da Rã-touro, através da caça dos animais que haviam sido introduzidos décadas antes e se disseminaram na ilha, chegando a produzir 900 toneladas em 1976. No Brasil, apesar de existirem espécies nativas, a única espécie cultivada é a Rã-touro, que possui características desejáveis a uma espécie de cultivo, como precocidade, prolificidade e rusticidade superiores a espécies nativas (CARRARO, 2008; CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013; FAO, 2021).

A produção mundial tem crescido nas últimas décadas, superando 2 mil toneladas/ano a partir de 2010, sendo os principais produtores são Brasil, Taiwan e México. A criação de Rã-touro ocorre há séculos nos Estados Unidos, mas sua introdução no Brasil ocorreu na década de 1930, sendo o primeiro relato do estabelecimento de uma ranicultura desta espécie fora da América do Norte. Na década de 1950, foram introduzidos os primeiros animais em Taiwan e meados de 1960 no México (FAO, 2021).

O Brasil apresenta um perfil diferente dos outros produtores de rãs, que optam por praticar a caça ou o cultivo extensivo. A partir da década de 1970, a cadeia produtiva da rã passou a se organizar para desenvolver tecnologias no setor, em parceria com instituições públicas permitindo a intensificação da criação, aprimorando os sistemas de alimentação, reprodução, estocagem, bem como os aspectos sanitários (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

1.2 Fases de produção da rã-touro

A criação de rãs possui 7 estágios, iniciando pela reprodução, passando por 4 fases de larvicultura, recria dos imagos até os 50g e encerramento com a engorda ou terminação. Portanto um ranário que realiza ciclo completo possui diferentes instalações e sistemas de cultivo para acompanhar o desenvolvimento do animal (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013). Existem tanto propriedades que realizam ciclo completo, quanto propriedades que exploram apenas a última fase, adquirindo a forma jovem da rã e realizando a engorda até o abate (CARRARO, 2008; SOUSA; MALTAROLO, 2019).

Uma característica da produção no Brasil é o manejo intensivo, no qual os animais são criados em sistemas de confinamento com alta densidade. Por serem realizados em condições controladas estes sistemas demandam manejos de limpeza, bem como maior renovação de água. Os animais são tratados com ração para peixes carnívoros devido a não disponibilidade de rações comerciais voltadas para a produção de rãs touro (OLIVEIRA, 2015).

1.1.1 Reprodução

O manejo de reprodução pode ocorrer através do acasalamento natural ou pela técnica de reprodução induzida (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013; MILYANA DA SILVA LEAL, 2021). Em ambos os casos, inicialmente são selecionados os reprodutores, com aspecto saudável, possuindo em torno de 400 a 500g e que se apresentem aptos a reprodução, sendo os machos avaliados de acordo com a dilatação e intensificação da coloração amarela na região gular e o comportamento de amplexo nupcial, e fêmeas com dilatação da região abdominal (LIMA; AGOSTINHO, 1992; CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

No modelo tradicional de reprodução, os animais são alojados coletivamente na área de acasalamento, mantendo-se a proporção de 1 macho para cada 2 ou 3 fêmeas, sendo os machos substituídos semanalmente e as fêmeas após desovarem. O sistema é considerado semi-seco, pois possui piscinas para a formação de casais, onde eles realizarão acasalamento e a deposição dos ovos, sendo uma piscina para cada macho. Após os animais serem introduzidos ao recinto, não existe interferência humana. A desova é coletada e introduzidos em tanques de incubação (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

No sistema de reprodução artificial os animais são alojados separadamente, e quando considerados aptos a reprodução, são submetidos a um tratamento hormonal que induz a desova e produção espermática. Ao contrário do acasalamento, na reprodução artificial é utilizado uma

proporção de 3 machos para cada fêmea. Após o protocolo hormonal, as fêmeas têm seus ovócitos coletados por meio de compressão leve do ventre, estes são depositados em recipiente limpo, onde receberão o esperma coletado dos machos, diluído em água. Posteriormente os ovos são introduzidos em tanques de incubação (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013; MILYANA DA SILVA LEAL, 2021).

Aos reprodutores, é indicado a utilização de ração para peixes carnívoros com granulometria em torno de 8-15mm, com teor de proteína bruta de 40-42%, sendo importante ressaltar que os animais realizam jejum espontâneo no período de acasalamento, portanto não é fornecido alimento no período de manejo reprodutivo. Este jejum é importante para a limpeza da cloaca e prevenção de contaminação na desova (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

1.1.2 Girinagem

Após a eclosão do girino, inicia-se a fase de larva inicial, marcada pela ausência de aparato digestório adaptado a ingestão de alimentos, presença do saco vitelínico e brânquias (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

Cerca de uma semana após a eclosão os girinos entram no segundo estágio de vida, onde já absorveram o saco vitelínico, bem como suas brânquias foram internalizadas e o animal está apto a consumir alimentos do meio, iniciando a fase em que são detritívoros ou herbívoros. Pode se utilizar uma dieta de alimento natural, algas e plânctons, combinado com alimento artificial, bem como o fornecimento apenas de ração farelada contendo 40% de proteína bruta (TAVARES; MORAIS; STÉFANI, 2008).

Na terceira fase, o animal passa a desenvolver os membros posteriores e ao final da quarta fase, a metamorfose está completa, com o crescimento de todos os membros e absorção da cauda. A alimentação se mantém a mesma, mas é importante separar os animais de acordo com o seu tamanho, e proporcionar um ambiente semi-alagado para o estágio final (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

Nas fases de girinagem, qualidade da água é primordial para manter a sanidade e a produtividade. Temperatura em torno de 23°C, pH oscilando entre 6,5 a 7,5, níveis de Amônia e Nitrito inferiores a 0,5 mg/L e oxigênio dissolvido superior a 4 mg/L, estes são os principais parâmetros que devem ser almejados através de análises diárias do setor (TAVARES; MORAIS; STÉFANI, 2008; CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

1.1.3 Recria e engorda

O sistema de recria se inicia com a transferência dos imagos que acabaram de finalizar sua metamorfose sendo transferidos a um novo sistema de criação. Estes animais que chegam com aproximadamente 8 a 10g, são considerados imagos até atingirem 50g, depois passam a ser considerados rãs e entram na fase de engorda.

No período anterior a metamorfose, o animal apresenta dependência completa de ambientes aquáticos, após este período os animais ainda apresentam a demanda por ambientes enriquecidos com água, mas em sistemas alagados ou semi alagados. A utilização de instalações que protejam os animais de predadores e evitem fugas são fundamentais para a evolução da produção e obtenção de maior produtividade (OLIVEIRA, 2015).

No sistema de recria e engorda, os animais são transportados para baias inundadas ou semi-inundadas. Devido ao modelo de alimentação deste animal, que apresenta maior predileção para alimentos em movimento, o fornecimento de ração precisa acontecer pelo menos 3 vezes ao dia. Em relação a alimentação o sistema inundado apresenta vantagem em relação ao semi-inundado, pois o movimento da ração na água estimula a ingestão (CASTRO, 2010).

Dos sistemas semi alagados se destacam os sistemas de Tanque ilha que possui uma área central seca com as laterais alagadas, confinamento que conta com uma área retangular preenchida com 40% a 70% de água e o restante do piso cimentado onde se fornece o alimento. Anfigranja que também possui formato retangular, mas neste caso área seca, cocho e área alagada se estendem por toda área em formato linear e o sistema Ranabox que é caracterizado por baias verticais sobrepostas umas as outras visando a economia de espaço. Todos estes sistemas atualmente podem aumentar sua eficiência, com o aumento da proporção de área alagada das estruturas (CRIBB; AFONSO; MOSTÉRIO, 2013).

O sistema de produção alagado, que passou a ser utilizado recentemente no Brasil, possibilita o aumento na densidade populacional nas baias e facilita a alimentação. Melhorando os índices econômicos e zootécnicos. Neste sistema os animais ficam em um recinto completamente alagado, apenas com a cabeça fora d'água (OLIVEIRA, 2015). O surgimento de doenças infecciosas no ambiente alagado também é mais provável, tanto pela maior densidade populacional, quanto pelo fato de os animais estarem compartilhando a água, alimento e excretas em período integral.

1.3 Imunologia

O sistema imune da rã-touro, é composto de imunidade inata e imunidade adaptativa, participam da resposta imune das rãs células inflamatórias, agentes químicos e hormônios imunomoduladores (FIGUEIREDO et al., 2021). A imunidade inata é responsável pela resposta primária ao patógeno, nela ocorre o recrutamento de células de defesa inespecíficas, como macrófagos e neutrófilos, nesta fase também ocorre a produção de citocinas que irão apresentar o antígeno ao sistema imune adaptativo. Também estão envolvidos glicocorticoides, hormônios gonadais e melatonina, que são influenciados por fatores externos como temperatura, stress e alimentação, estes hormônios por sua vez, podem atuar estimulando ou inibindo o sistema imune, de acordo com doses secretadas e período de duração (ASSIS et al., 2017; FIGUEIREDO et al., 2021).

As rãs touro pertencem ao subfilo Gnathomata, que inclui os anfíbios, mamíferos, répteis, aves e a maior parte dos peixes. Estes animais possuem e expressam genes que dão origem a Receptores de células B, Receptores de célula T e o Complexo principal de histocompatibilidade, juntos eles são os responsáveis pela imunidade adaptativa que tem como característica importante a adaptabilidade e a memória em relação a patógenos. Apesar de possuírem genes semelhantes cada classe de animais expressa determinados fatores imunitários que definem o potencial da resposta imune adaptativa (FLAJNIK; KASAHARA, 2010).

O ambiente de confinamento gera um desconforto frequente para o animal e pode ocasionar em aumento dos níveis de glicocorticoide, que por sua vez prejudica a resposta imune (ASSIS et al., 2017). O manejo de biometria, que consiste em realizar a pesagem de uma amostra do lote de produção comercial para identificar peso médio do lote, planejar o arraçamento e avaliar o desempenho, pode causar estresse momentâneo aos animais, assim como o transporte, em ambos os procedimentos os animais retornam as condições pré-manejo (SANTOS1 et al., 2020; SANTOS et al., 2021).

1.4 Principais doenças infecciosas na ranicultura

1.4.1 Período pré metamorfose

Apresentando uma alta mortalidade em girinos, o Frog vírus 3(FV3) é responsável por causar a ranavirose, sendo um grande desafio na ranicultura. A doença que possui ampla distribuição mundial, apresenta altas taxas de mortalidade, morbidade e capacidade de infectar outras espécies de peixes, anfíbios e répteis, sendo considerada doença de notificação

obrigatória (CANDIDO et al., 2019; DA SILVA et al., 2020). A ranavirose é considerada uma das principais doenças emergentes de importância econômica e ecológica em vertebrados peçilotermos (CANDIDO et al., 2019).

A doença acomete principalmente as fases iniciais devido ao baixo desenvolvimento do sistema imunológico, e pode causar sinais clínicos amplos como a perda de coordenação motora, caquexia e inapetência e síndrome hemorrágica aguda, bem como sinais específicos como necrose de tecidos hepáticos, linfoides hematopoiéticos, dermatite ulcerativa e enterite (CLAYTOR et al., 2017; DA SILVA et al., 2020).

O FV3 já foi descrito em 5 continentes, causando altas mortalidades em diversas espécies. No Brasil, estudos apontam para a identificação do vírus em produção comercial de Rã-touro nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás, em todos os casos foi identificada a infecção em girinos, com alta mortalidade morbidade (MAZZONI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2020).

O fungo *Batrachocytrium dendrobatidis*, pode ocorrer como infecção secundária, aumentando a severidade da doença (WATTERS et al., 2018). Em condições normais, a rã-touro pode servir de reservatório para o fungo, que pode acometer outras espécies de anfíbios, causando desequilíbrio ecológico (GARNER et al., 2006). Bactérias como *Streptococcus* spp. Também já foram identificadas como causadores de infecções secundárias a ranavirose (MAZZONI et al., 2012)

1.4.2 Período pós metamorfose

1.4.2.1 Red leg

A síndrome da perna vermelha (“Red leg syndrome”) ocorre a partir de um importante patógeno de organismos aquáticos, a bactéria *Aeromonas hydrophila*, no entanto pode estar associada a presença de outros agentes como *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii* e *Pseudomonas aureginosa*, e até mesmo associação com a ranavirose (PESSIER, 2017; DA SILVA et al., 2020).

A síndrome da perna vermelha, tem como principais manifestações clínicas eritema cutâneo, descamações e úlceras e necrose epitelial, além de manifestações de comportamento como ataxia e anorexia. Muitas manifestações que se enquadram nesta sintomatologia foram descritas como red leg e ainda existe a carência de se caracterizar mais profundamente,

principalmente pela doença se manifestar em decorrência de imunossupressão, fase em que o animal está mais susceptível a qualquer agente ambiental (PESSIER, 2017).

Os agentes envolvidos também causam doenças em outras espécies de anfíbios e peixes. Na produção de tilápia *Aeromonas hydrophyla* é um importante patógeno, portanto o cuidado para não ocorrer o contato entre as espécies direta ou indiretamente evita o risco de contaminação cruzada. Recentemente, foram identificados surtos com alta mortalidade em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de doença causada por *Aeromonas jandaei*, que já havia sido descrita causando doença em outros peixes como tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pirarucu (*Arapaima gigas*), em répteis (*Crocodilus siamensis*), mostrando a versatilidade de patógenos aquáticos a se adaptar a diferentes hospedeiros (DELPHINO et al., 2019a; ASSANE et al., 2021).

1.4.2.2 Estreptococose

Streptococcus agalactiae possuem ampla distribuição mundial e são conhecidos por causar doenças em diversas espécies animais como infecções neonatais em humanos, mastite em bovinos e septicemia em peixes. Além disto, possuem potencial zoonótico, o que aumenta ainda mais a importância da vigilância sobre estes patógenos (BOHNSACK et al., 2004; EVANS et al., 2009; DELANNOY et al., 2013). Na aquicultura, é conhecida como uma bactéria causadora de grandes perdas econômicas devido a surtos com alta mortalidade em tilápias na fase final da terminação (KAWASAKI et al., 2018).

Streptococcus agalactiae é uma bactéria gram positiva, pertencente ao grupo B de Lancefield, que pode ser classificada em diferentes sorotipos de acordo com o perfil capsular antigênico (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, IX). Os perfis encontrados no Brasil que causam infecção em organismos aquáticos são do tipo Ia, Ib e III, o último com potencial zoonótico (FIOLO et al., 2012; DELANNOY et al., 2013; CHIDEROLI et al., 2017).

Um estudo realizado na Austrália apresenta a hipótese da disseminação e adaptação da bactéria entre hospedeiros marinhos a partir da importação de tilápias infectadas. As análises realizadas no estudo mostram perfis relacionados a isolados de diversos continentes, inclusive do Brasil, o que deixa mais evidente o potencial de disseminação e adaptação do patógeno (KAWASAKI et al., 2018). Os sinais clínicos apresentados nas diferentes espécies animais contempla principalmente, sinais neurológicos como natação errática, comprometimento do

globo ocular e aumento de volume abdominal (PILARSKI; SCHOCKEN-ITURRINO, 2010; KALIMUDDIN et al., 2017; DA SILVA et al., 2020)

Os estudos conduzidos na Austrália, mostram a disseminação da doença em arraias, garoupas e outras espécies de peixe. A bactéria, nos exames microbiológicos, se apresentou como cocos Gram positivos agrupados em pares ou cadeias, não hemolíticos. Os isolados foram encontrados e amostras de cérebro, olho, coração, fígado, rim, baço, abscessos na pele. Nas amostras coletadas para histopatológico foi possível identificar meningite, infiltrado linfocítico no cérebro, inflamação das células da glia, lesões granulomatosas no olho, necrose hepática, inflamação granulomatosa no coração, presença de infiltrado de leucócitos no coração (BOWATER et al., 2012, 2018).

A produção de tilápia no Brasil está bastante susceptível a perdas econômicas devido a surtos de estreptococose com alta mortalidade acometendo indivíduos já na fase final da produção. Atualmente, o método mais eficiente para controle da doença é a vacinação. A utilização da vacina reduz os prejuízos com mortalidade e subprodução, assim como a economia com o uso de antibióticos, sendo o custo da mesma inferior ao que ela gera de economia em casos de surtos com alta mortalidade por *S. agalactiae*. (DELPHINO et al., 2019b)

O primeiro relato de *Streptococcus* spp. como prováveis causador de doença em rãs ocorreu em 1983. As amostras foram identificadas como cocos Gram positivos, agrupados em duplas ou pequenas cadeias, não hemolíticas, pertencentes ao grupo B de Lancefield. Os autores descrevem a doença causada em Rãs touro como causando septicemia, esplenite necrosante, hepatite com hemorragia hepática e renal. O estudo descreve o desenvolvimento da estreptococose em outros peixes, e sugere o stress como um fator importante no desenvolvimento da doença (AMBORSKI et al., 1983).

Com a intensificação da produção no Brasil, foi possível identificar um aumento dos problemas relacionados a doenças infecciosas na ranicultura, inclusive da estreptococose. Em um estudo conduzido em 2009 foi possível identificar animais provenientes de dois ranários apresentando anorexia, natação errática e circular, letargia, escurecimento da pele petéquias e mortalidade em massa. Nesse caso, foram isolados *Streptococcus* spp. em amostras de rim, fígado, baço, cérebro e líquido ascítico. Através das características bioquímicas foi identificado *Streptococcus* spp. A bactéria encontrada apresentou algum grau de resistência a 12 de 14 antibióticos testados, sendo sensível apenas a gentamicina e cloranfenicol (PILARSKI; SCHOCKEN-ITURRINO, 2010).

1.4.3 Epidemiologia molecular do *Streptococcus agalactiae*

A utilização de técnicas moleculares para identificação de patógenos permite maior precisão na identificação e caracterização dos mesmos. A técnica de “Multilocus sequence Typing” (MLST) é um método que utiliza o sequenciamento de fragmentos com aproximadamente 500 pares de base de 7 genes housekeeping. O MLST é uma importante ferramenta nos estudos de epidemiologia molecular, devido a sua simplicidade comparado ao sequenciamento de genoma completo. Este possui maior base de informações e permite uma comparação mais completa com bancos de dados do mundo. Esta técnica pode ser utilizada para estudos epidemiológicos com os estreptococos do grupo B (JONES et al., 2003; DELANNOY et al., 2013).

As análises de MLST são referências para investigações epidemiológicas e genéticas com os estreptococos do grupo B, com os resultados do sequenciamento dos fragmentos dos genes housekeeping (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK* e *tkl*) do MLST as amostras são registradas em sequence types (STs). Ainda assim é possível existir diferença entre indivíduos do mesmo ST, portanto para o estudo de genes de virulência, resistência antimicrobiana e outros que visem o entendimento individual do organismo a partir do genoma é interessante a utilização de técnicas auxiliares ou o sequenciamento de genoma completo (JONES et al., 2003; DELANNOY et al., 2013; GODOY et al., 2013).

Um estudo conduzido no Brasil no ano de 2013, utilizando a sorotipagem capsular, MLST e caracterização de genes de virulência permitiu a identificação e análise de 46 isolados de *S. agalactiae* em tilápias do Nilo e Pintado da Amazônia, permitiu a identificação de diferentes sorotipos e STs em diferentes regiões do país. Foram identificados os STs 103(Ia) , 260(Ib) , 552(Ib), não tipável (NT) e 553(Ib). As amostras pertencentes aos grupos STs 260, 552 e 553 foram agrupadas no mesmo complexo clonal, 552, o qual se encontra a maior parte dos isolados brasileiros, destes, a ST260 foi encontrada nos estados do nordeste e a ST552 no centro oeste, sul e sudeste. O ST103, isolado na Bahia, foi associado a infecções em peixes pela primeira vez neste estudo não se enquadrando em algum complexo clonal. Com as análises de MLST foi possível uma identificação mais precisa, em relação a sorotipagem capsular, no entanto, algumas amostras pertencentes aos mesmos STs apresentaram perfis de genes de virulência diferentes, demonstrando a adaptação dos organismos a diferentes ambientes (GODOY et al., 2013).

Um estudo realizado na China, em 10 fazendas de 5 distritos da província de Guandong, coletou amostras de tilápias, sem sintomas aparentes de estreptococose, com peso médio de 2,5 kg. Foram coletadas amostras para exame bacteriológico de animais que apresentaram lesão

muscular, ao final do procedimento foram obtidas 146 amostras de *S. agalactiae* que foram submetidas ao MLST. As amostras foram pertencentes ao ST 7 que pertence ao complexo clonal 7, distribuído pela Ásia e Europa e encontrados em diversas fontes como amostras de humanos, leite de vaca, e amostras de peixe (SUN et al., 2016). Este estudo mostra a presença do *S. agalactiae* em indivíduos mais velhos de forma assintomática, fator que propicia a permanência de indivíduos portadores da bactéria no meio sem tratamento adequado.

Em um estudo realizado, 2017, com amostras brasileiras de *S. agalactiae* coletadas em peixes propõe a modificação dos complexos clonais do sorotipo Ib propostas por Godoy et. al(2013) , isto devido a algumas amostras não apresentarem o gene *glcK*, sendo este então considerado não tipável (NT), o complexo clonal 552 passa a ser então dividido em CC260, composto pelos STs 260, 927, 259 e a amostra STIR-CD-17, e o segundo grupo, composto pelo ST 257, e as amostras não tipáveis. O estudo mostra que as amostras consideradas NT estão presentes exclusivamente na região centro-sul do Brasil. O estudo também demonstra que as amostras NTs emergiram mais recentemente, cerca de 70 anos atrás, e indica a produção de vacinas adaptadas a este sorotipo com possível adaptação para novos hospedeiros (BARONY et al., 2017).

Até o ano de 2016 os relatos de *S. agalactiae* em organismos aquáticos no Brasil eram relacionados apenas ao sorotipo Ib predominantemente e ao sorotipo Ia, no entanto em surtos ocorridos entre 2016 e 2017, em fazendas de tilápia nos estados do Piauí, Pernambuco, Ceará e Bahia, foi possível identificar indivíduos pertencentes ao sorotipo III. Os surtos apresentaram alta mortalidade em plantéis vacinados para o sorotipo Ib, os peixes também apresentaram letargia, melanose e exoftalmia. Todas amostras do sorotipo III foram pertencentes ao ST283 e também foram encontradas 3 amostras do sorotipo Ib ST260. O ST283 até então havia sido descrito apenas em países do sudeste da Ásia, o que indica uma provável entrada do patógeno através da importação de tilápias. Na Ásia o ST283 já foi encontrado causando surtos de doença em humanos relacionados ao consumo de peixe (CHAU et al., 2017; LEAL et al., 2019)

Na Austrália, tilápias do Nilo importadas na década de 70 e 80 são a provável origem de uma disseminação de *S. agalactiae* Ib ST261 em espécies marinhas de peixes, garoupas, arraias, tainhas e outros peixes. Exoftalmia, natação errática, flutuação na superfície foram observados nos animais doentes. O complexo clonal do ST261 pode ser encontrado na Ásia, Europa, Oceania, África e América do Norte. O estudo observa que a evolução do *S. agalactiae* sorotipo Ib, considerando ST260, ST261 e ST552, para se adaptar a organismos aquáticos passa por um processo de redução do genoma, comparado a sorotipos de animais terrestres, o que

dificulta a caracterização e correlação entre diferentes isolados, apenas utilizando o MLST.(BOWATER et al., 2012, 2018; KAWASAKI et al., 2018)

Considerações finais

O cultivo da rã-touro no Brasil vem sendo executado de maneira intensiva e com constante desenvolvimento tecnológico proporcionando um cenário propício ao aumento da produção, no entanto este crescimento passa a ser ameaçado caso o setor não avance nos estudos a cerca dos potenciais patógenos. Espécies que acometem outros organismos aquáticos podem se desenvolver e passar a infectar as rãs-touro, principalmente em sistemas com alta densidade populacional, por isto é fundamental o desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao diagnóstico, manejo preventivo e a sanidade destes animais.

REFERÊNCIAS

- AMBORSKI, R. L. et al. A non-hemolytic, group B *Streptococcus* infection of cultured bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in Brazil. **Journal of wildlife diseases**, v. 19, n. 3, p. 180–184, 1983.
- ASSANE, I. M. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Aeromonas jandaei* involved in mass mortalities of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Brazil. **Aquaculture**, v. 541, 2021. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0044848621005111?token=2FBC45D69BFE1104CB491813C84E4E111F1D9E569466286F44CAE801DADDA05B54820D7B386A3060F8E6F27C702E8D83&originRegion=us-east-1&originCreation=20210911191440>>. Acesso em: 11 set. 2021.
- ASSIS, V. R. et al. Corticosterone transdermal application in toads (*Rhinella icterica*): Effects on cellular and humoral immunity and steroid plasma levels. **J. Exp. Zool.**, n. March, p. 1–14, 2017.
- BARONY, G. M. et al. Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. **Scientific Reports**, n. April, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13228-z>>.
- BOHNSACK, J. F. et al. Serotype III *Streptococcus agalactiae* from bovine milk and human neonatal infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1412–1419, 2004.
- BOWATER, R. O. et al. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern. **Journal of Fish Diseases**, v. 35, p. 173–186, 2012.
- BOWATER, R. O. et al. Epizootics of *Streptococcus agalactiae* infection in captive rays from Queensland, Australia. **Journal of Fish Diseases**, v. 41, n. 2, p. 223–232, 2018.
- CANDIDO, M. et al. Genome analysis of Ranavirus frog virus 3 isolated from American Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in South America. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- CARRARO, K. C. Ranicultura: Um bom negócio que contribui para a saúde. **Revista da FAE**, v. 11, n. 1, p. 111–118, 2008.
- CASTRO, C. S. D. E. **Taxas e frequências de alimentação na produção de rã-touro em baias inundadas**. 2010. Universidade Estadual Paulista, 2010.
- CHAU, M. L. et al. Group B *Streptococcus* infections caused by improper sourcing and handling of fish for raw consumption, Singapore, 2015–2016. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 12, p. 1982–1990, 2017.
- CHIDEROLI, R. T. et al. Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. **Aquaculture**, v. 479, n. May, p. 45–51, 2017.

CLAYTOR, S. C. et al. Ranavirus phylogenomics: Signatures of recombination and inversions among bullfrog ranaculture isolates. **Virology**, v. 511, n. July, p. 330–343, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2017.07.028>>.

CRIBB, A. Y.; AFONSO, A. M.; MOSTÉRIO, C. M. F. **Manual Técnico de Ranicultura**. [s.l.: s.n.].v. 1

DA SILVA, G. R. et al. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS PRINCIPAIS DOENÇAS EMERGENTES EM RÃS TOURO AMERICANA (*Lithobates catesbeianus*) EM SISTEMAS DE CRIAÇÃO INTENSIVO. p. 530–543, 2020.

DELANNOY, C. M. J. et al. Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, 2013.

DELPHINO, M. K. V. C. et al. Seasonal dynamics of bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir. **Aquaculture**, v. 498, n. July 2018, p. 100–108, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.023>>.

DELPHINO, M. K. V. C. et al. Economic appraisal of vaccination against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia farms in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 162, n. November 2018, p. 131–135, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.12.003>>.

EVANS, J. J. et al. Human *streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 774–776, 2009.

FAO. **FAO Fisheries & Aquaculture - Cultured Aquatic Species Information Programme - *Rana catesbeiana* (Shaw, 1862)**. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/en#tcNA0112>. Acesso em: 18 jul. 2021.

FIGUEIREDO, A. C. De et al. Systemic hormonal and immune regulation induced by intraperitoneal LPS injection in bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 253, n. December 2020, p. 110872, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110872>>.

FIOLO, K. et al. Infection rate and *streptococcus agalactiae* serotypes in samples of infected neonates in the city of Campinas (São Paulo), Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, v. 34, n. 12, p. 544–549, 2012.

FLAJNIK, M. F.; KASAHARA, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. JANuARy, p. 47–59, 2010.

GARNER, T. W. J. et al. The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Biology Letters**, v. 2, n. 3, p. 455–459, 2006.

GODOY, D. T. et al. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 476–483, 2013.

IUCN-SSC-AMPHIBIAN-SPECIALIST-GROUP. *Lithobates catesbeianus* (American Bullfrog). Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/58565/53969770>>. Acesso em: 18 jul. 2021.

JONES, N. et al. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2530–2536, 1 jun. 2003. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/jcm>>. Acesso em: 7 jun. 2021.

KALIMUDDIN, S. et al. 2015 Epidemic of severe *streptococcus agalactiae* sequence type 283 infections in Singapore associated with the consumption of raw freshwater fish: A detailed analysis of clinical, epidemiological, and bacterial sequencing data. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. Suppl 2, p. S145–S152, 2017.

KAWASAKI, M. et al. Microevolution of *Streptococcus agalactiae* ST-261 from Australia indicates dissemination via imported tilapia and ongoing adaptation to marine hosts or environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 16, p. 1–17, 2018.

LEAL, C. A. G. et al. *Streptococcus agalactiae*. **Emerging Infectious Diseases** •, v. 25, n. 4, p. 776–779, 2019.

LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. ângelo. **A criação de rãs**. Viçosa, MG: UFV/Impr. Univ., 1992.
MAZZONI, R. et al. Mass mortality associated with a frog virus 3-like Ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 86, n. 3, p. 181–191, 2009.

MAZZONI, R. A. et al. Septicemia em girinos de criação na fase pré-metamórfica. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 76–84, 2012.

MILYANA DA SILVA LEAL, M. M. P. CICLO ANUAL REPRODUTIVO DE RÃS-TOURO (*Lithobates catesbeianus*) NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 11, n. Março, 2021, p. 14–21, 2021. Disponível em: <<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>>.

OLIVEIRA, C. R. et al. Detection and molecular characterization of Frog virus 3 in bullfrogs from frog farms in Brazil. **Aquaculture**, v. 516, n. 734575, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734575>>.

OLIVEIRA, E. G. de. RANICULTURA: NOVOS DESAFIOS E PERSPECTIVAS DO MERCADO. **Ciência animal**, v. 25, n. Iii, p. 6, 2015.
PESSIER, A. P. **Hopping Over Red Leg: The Metamorphosis of Amphibian Pathology** *Veterinary Pathology*, 2017. .

PILARSKI, F.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Isolamento e resistência a antimicrobianos de cepas de *Streptococcus* spp. provenientes de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1275–1279, 2010.

SANTOS, B. D. dos et al. Transport stress in bullfrog: Hematological and plasma biochemical responses. **Aquaculture Reports**, v. 19, n. August 2020, 2021.

SANTOS¹, N. N. dos et al. Estresse de biometria em rã-touro (*Lithobates catesbeianus*):

respostas hematológicas e bioquímicas. **13º Encontro Nacional de Ranicultura (Enar) e 4º International Meeting on Frog Research and Technology (Technofrog)**, 9 nov. 2020. Disponível em: <<https://ocs.ufgd.edu.br/index.php?conference=enar-technofrog&schedConf=enar-technofrog&page=paper&op=view&path%5B%5D=1090>>. Acesso em: 14 set. 2021.

SOUSA, R. G. C.; MALTAROLO, R. C. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE RÃ-TOURO *Lithobates catesbeianus* NO ESTADO DE RONDÔNIA (BRASIL). **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 6, n. 1, p. 45–53, 2019.

SUN, J. et al. Inapparent *Streptococcus agalactiae* infection in adult/commercial tilapia. **Scientific Reports**, v. 6, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep26319>>.

TAVARES, L. H. S.; MORAIS, J. C. L. de; STÉFANI, M. V. De. Comportamento alimentar e qualidade da água em tanques de criação de girinos de rã-touro *Rana catesbeiana*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 1, 2008.

WATTERS, J. L. et al. Concurrent Infection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Ranavirus* among Native Amphibians from Northeastern Oklahoma, USA. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 30, n. 4, p. 291–301, 2018.

CAPÍTULO 2: CHARACTERIZATION AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF THE *Streptococcus agalactiae* INFECTION IN FARMED BULLFROG (*Lithobates catesbeianus*) IN BRAZIL

ABSTRACT

Brazil is one of the biggest producer of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in the world, highlighted to the intensive and tecnificate production compared to another countries. One of the systems used currently is the flooded system that allows greater productivity but increase risks to infectious diseases, among them the streptococcosis. This study aims to identify the pathogen and characterize the disease in outbreaks occurred between december 2018 and June 2019, on a brazilian bullfrog farm at SEAQUI-UFU in Uberlândia-MG and understand the molecular epidemiology. Animals with clinical signs were sent to AQUACERRADO-UFU for samples collection for histopathological and microbiological analysis. The isolates of microbiological were submitted to phenotypical analysis, MALDi-TOF, capsular serotyping test and MLST. Bullfrogs collected presented lethargy, skin lesions, neurological signs, ascites, edema, petechiaes and signals of septicemia. Our results showed that *Streptococcus agalactiae* Ib non-typeable on MLST approach, was the agent causing disease. This is the first description of *Streptococcus agalactiae* in bullfrog. The isolated is genetically similar to another tilapia isolates, there are some relates of different species being infected in a cross relation by similar samples of *S. agalactiae*, and this let us think that could be happen a cross infection between tilapia and bullfrogs in the farm. This study is important to create standards for posterior researchs about sanity of bullfrogs.

Keywords

Amphibians; GBS; MLST; outbreak; encephalitis.

1. INTRODUCTION

Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) is the most important frog specie on the world amphifarms and Brazil is one of the mainly producers but different of the others, the country adopted intensive systems of production like inundated and semi-dry (Cribb et al. 2013).

Bullfrog culture become more technologic every year and inundated system, the most current, is important to increase the stocking rate, providing greater productivity, but with this model is important to pay more attention with the risk of infectious diseases (Cribb et al. 2013, Nascimento et al. 2019). The culture of bullfrog produces a high level of organic and inorganic waste, and health is an important question, being an obstacle to the growth of the sector. So spread of pathogens become more easy when many animals are confined in inundated system sharing food and excreta, understand the pathogens that emerges on that system is important to provide a growth scenario to bullfrog culture (Mello et al. 2016, Peres 2018, Oliveira et al. 2020).

Because of the high stockage density and excess of food, species of *Streptococcus* genus become one of the emergent pathogens in bullfrog culture (Pilarski & Schocken-Iturrino 2010). Amborski et al. (1983) reported *Streptococcus* spp. as the probable cause of infection in cultured bullfrogs in Brazilian North, causing a mortality of approximately 80%, considering stress a factor at the development of the disease. Another study, in 2010, identify *Streptococcus* spp. causing disease in two different bullfrog farms in Brazilian southeast, the animals presented anorexia, erratic swimming, lethargy, petechiae and massive mortality. The study tested the resistance of the isolate to 14 antibiotics, and the *Streptococcus* spp. presents 100% of sensibility just to gentamicin and chloramphenicol (Pilarski & Schocken-Iturrino 2010).

Despite being poorly described in bullfrog production, *Streptococcus* spp. are opportunist pathogen, highly spread in aquatics environments (Pilarski & Schocken-Iturrino 2010, da Silva et al. 2020). In Brazilian tilapia cultures, between the possible streptococcosis, *Streptococcus agalactiae* is the most important pathogen, because of the economic loss, high mortality taxes or many subclinical infections. The mains clinical signs are meningoencephalitis, lethargy, septicemia and high mortality, signs similar of the strptococcosis in bullfrogs (Pilarski & Schocken-Iturrino 2010, Chideroli et al. 2017, Leal et al.

2019). In Australia, importation of infected tilapia (*Oreochromis spp.*) is the probable cause of marine aquatic hosts been infected with *S. agalactiae* serotype Ib, and that shows the potential of the bacteria to adapt to different aquatic hosts in short time (Kawasaki et al. 2018).

The present study aims to characterize the disease and identify the pathogen of outbreaks occurred in a bullfrog farm in Brazilian southeast, between December 2018 to June 2019, and understand the molecular epidemiology of isolates, standardizing information for future studies and trying to comprehend the origins of the disease.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Outbreak

At the aquaculture sector of Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Minas Gerais, Brazil, four outbreaks occurred between December 2018 to June 2019 in the final month of termination. The animals were storage in inundated system (Figure 1), that was adopted since September 2018, before was used the semi-intensive system, allocated in bays with about 300 individuals, density of 25 individuals per m². The system had constant renovation of water that



Figure 1. Bullfrog inundated system at SEAQUI-UFU.

become for a stream with presence of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), these bays were in a stove that provides temperature superior to 25 °C.

2.2 Samples

During the outbreak animals with clinical signs were sent to AQUACERRADO-UFU for identification of pathogens. After external exams, animals were euthanized according to AQUACERRADO standards and CONCEA normative (2015). At the necropsy, samples were collected for histopathological and microbiological analysis. For histopathological, samples of brain, hear, liver and lungs were storage in 10% formalin and sent to PatCenter-MG for stain with hematoxylin and eosin (Bowater et al. 2012).

For microbiological, samples of brain, hear, liver, lungs and ascitic liquid were collected with sterile SWAB, and spread in Blood Agar, 5% sheep blood, and incubated for 48 hours at 28°C, isolates that grow in this period were stocked in Brain Heart Infusion enriched with 15% glycerol and stocked at -80°C.

2.3 Isolates

Isolates were stored in BHI Broth enriched with 15% Glicerol at -80°C, were re-isolated in blood agar enriched with 5% of sheep blood (SBA) at 28°C, 48h after, samples were submitted to Gram, catalase and oxidase tests and sent to AQUAVET-Universidade Federal de Minas Gerais for precise identification using capsular serotyping, MALDI-TOF and MLST analysis.

2.3.1 Capsular serotyping

To identify the capsular polysaccharide typing of the 26 isolates was used the kit Immulex® Streptococcus Group B Type Ib (batch LSBIb-10, SSI Diagnostica, Denmark), following the recommendations of product.

2.3.2 MALDI-TOF

To identify the specie of pathogen, isolates were sent to MALDI-TOF for confirm the species of gram-positive cocci, according to Assis et al. (2017)

2.3.3 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Eight samples were selected to MLST analysis, considering the four dates of outbreak and five kind of samples (Brain, heart, liver, lung and ascitic liquid) that was made by 7 housekeeping genes typing (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *tkt* and *glcK*), according to Jones et al. (2003). Primers(Jones et al. 2003) were acquired from Integrated DNA Technologies (IDT, USA). PCRs were performed using kit HotStart Taq Polimerase (Qiagen, USA) at 25 µL final volume. PCR Mix composition and thermocycling conditions were explained on table 1.

All the reactions were conducted on Veriti 96-well Thermal Cycler equipment (Life Technologies, USA). PCR products was separated on QIAxcell Advanced using QX DNA Screening Kit (Qiagen) and purified using AMPure XP, Agencourt (Beckman Coulter, USA) according to the recommendations of product.

Sequencing reaction was performed with BigDye Terminator Cycle sequencing (Applied Biosystems, USA) kit, and analyzed on ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, USA). Sequences *forward* and *reverse* were used to determine allelic profile and sequence type (ST) of isolates using PUBMLST data to *S. agalactiae* (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-agalactiae>).

Table 1. Details of PCR reaction for MLST.

| Genes | Reaction mixture | PCR conditions |
|-------------|---------------------------------|------------------------------------|
| <i>atr</i> | Buffer 10X: 2.5 µL | Initial step: 95°C for 5 min |
| <i>glnA</i> | 25mM MgCl ² : 1.5 µL | Cycling: 35 cycles of 95°C for 1 |
| <i>tkt</i> | 10mM dNTP: 0.5 µL | min, 56°C for 45 s, and 72°C for 1 |
| | 10mM each primer: 0.5 µL | min; |

| | | |
|-------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| | Taq DNA Polymerase: 0.25 μ L | Final elongation: 72°C for 15 min |
| <i>glcK</i> | Buffer 10X: 2.5 μ L | Initial step: 95°C for 15 min |
| <i>pheS</i> | 25mM MgCl ₂ : 1.5 μ L | Cycling: 35 cycles of 95°C for 1 |
| | 10mM dNTP: 0.5 μ L | min, 56°C for 1 min, and 72°C for |
| | 10mM each primer: 0.5 μ L | 1 min; |
| | Taq DNA Polymerase: 0.25 μ L | Final elongation: 72°C for 10 min |
| <i>adhP</i> | Buffer 10X: 2.5 μ L | Initial step: 95°C for 5 min |
| <i>sdhA</i> | 25mM MgCl ₂ : 1.0 μ L | Cycling: 35 cycles of 95°C for 1 |
| | 10mM dNTP: 0.25 μ L | min, 56°C for 40 s, and 72°C for 1 |
| | 10mM each primer: 0.2 μ L | min; |
| | Taq DNA Polymerase: 0.05 μ L | Final elongation: 72°C for 10 min |

3.RESULTS

3.1 Outbreak Characterization

The main clinical signs observed during outbreaks were anorexia, lethargy, erratic swimming, lateral curvature of spine (figure 2), rostral skin lesions (figure 2), cornea opacity, haemorrhagic areas (figure 2) and edema in members, ascites (figure 2) and massive mortality about 55%. At necropsy observed blood filled vessels in brain, liver with increased size, liquid in abdominal cavity, necrotic areas in lungs.

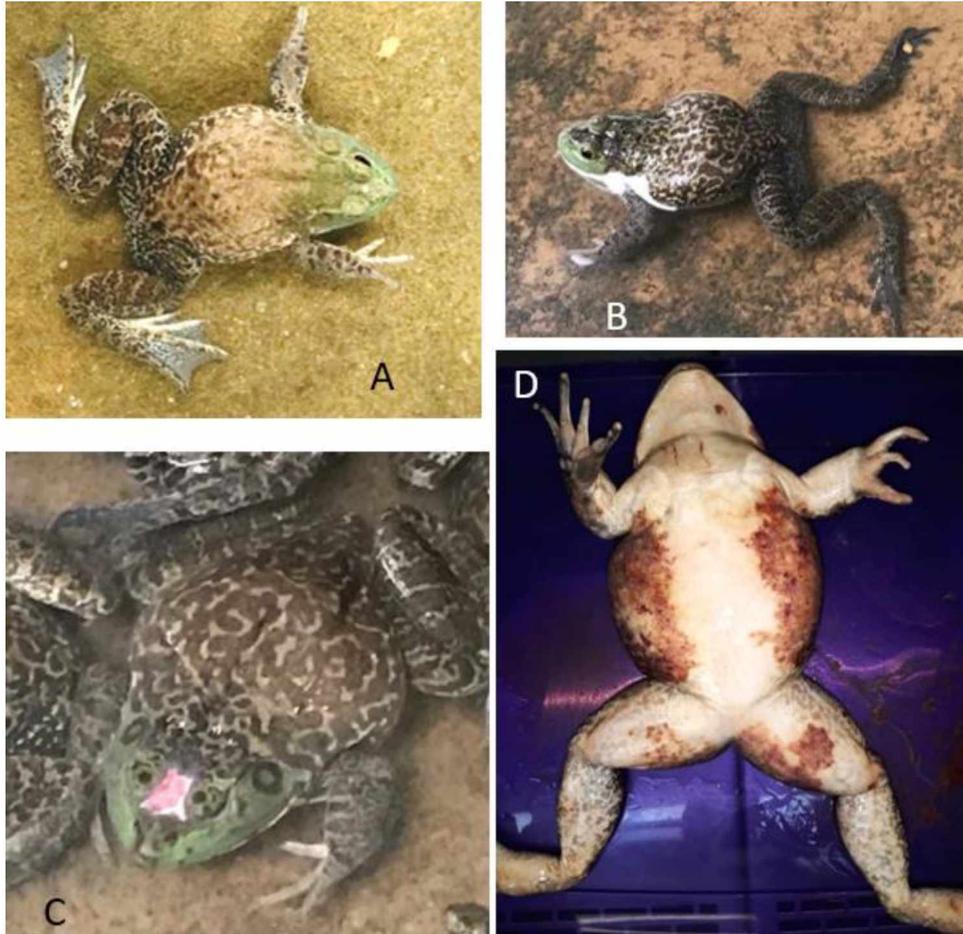


Figure 2. Bullfrog. A- Lateral curvature of spine. B-Ascitis. C-Rostral skin lesion. D-Haemorrhagic lesions in legs, torax and abdome.

Histopathological analysis was possible to identify, mononuclear meningitis, astrocitosis and edema in brain (Figure 2 and 3). Intracellular edema and presence of melanomacrophages in liver(Figure 4-A). Edema, mononuclear pericarditis and thrombus in vascular structure at heart(figure 4-B).

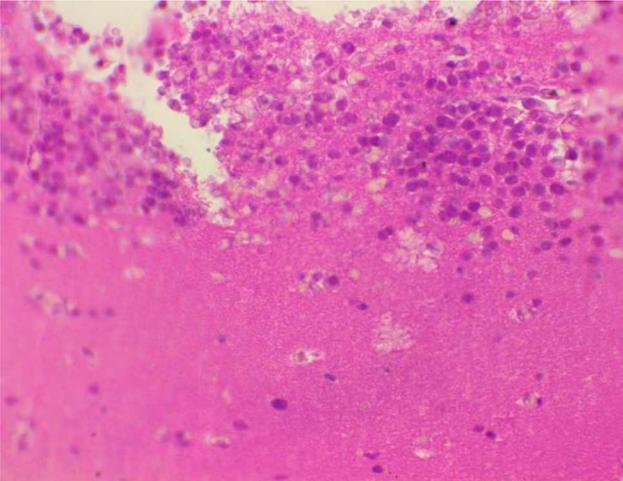


Figure 3. Photomicrograph of Brain fragment with the presence of mononuclear inflammatory cells in the meninges, characterizing meningitis.

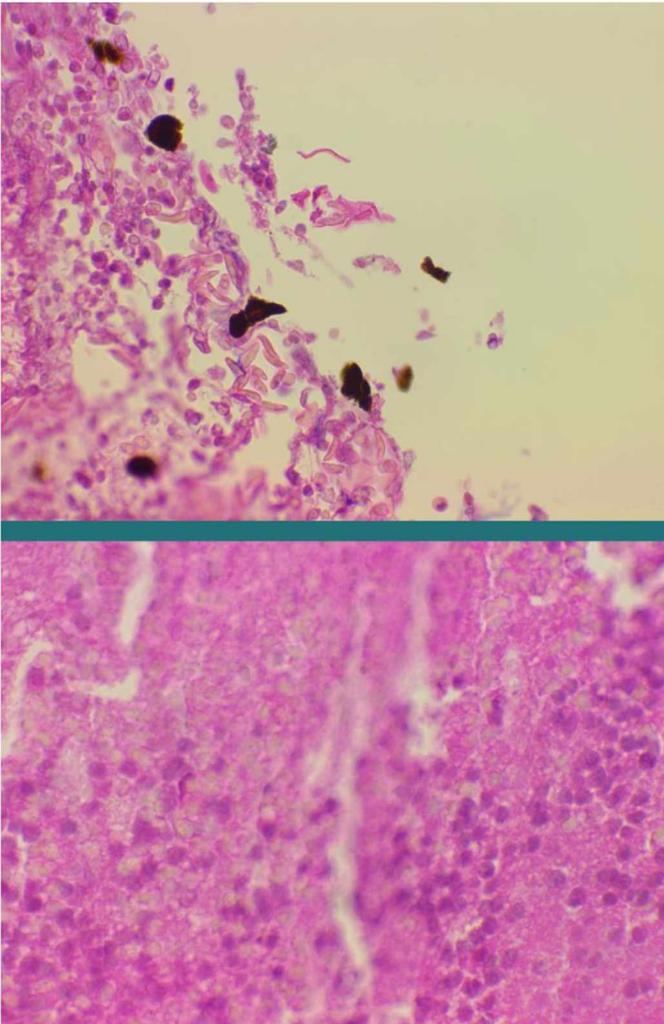


Figure 4. Photomicrograph of brain. There was an increase in glial cells randomly by the fragment, and multifocal areas of hemorrhage. Increased Virchow space, characterizing edema

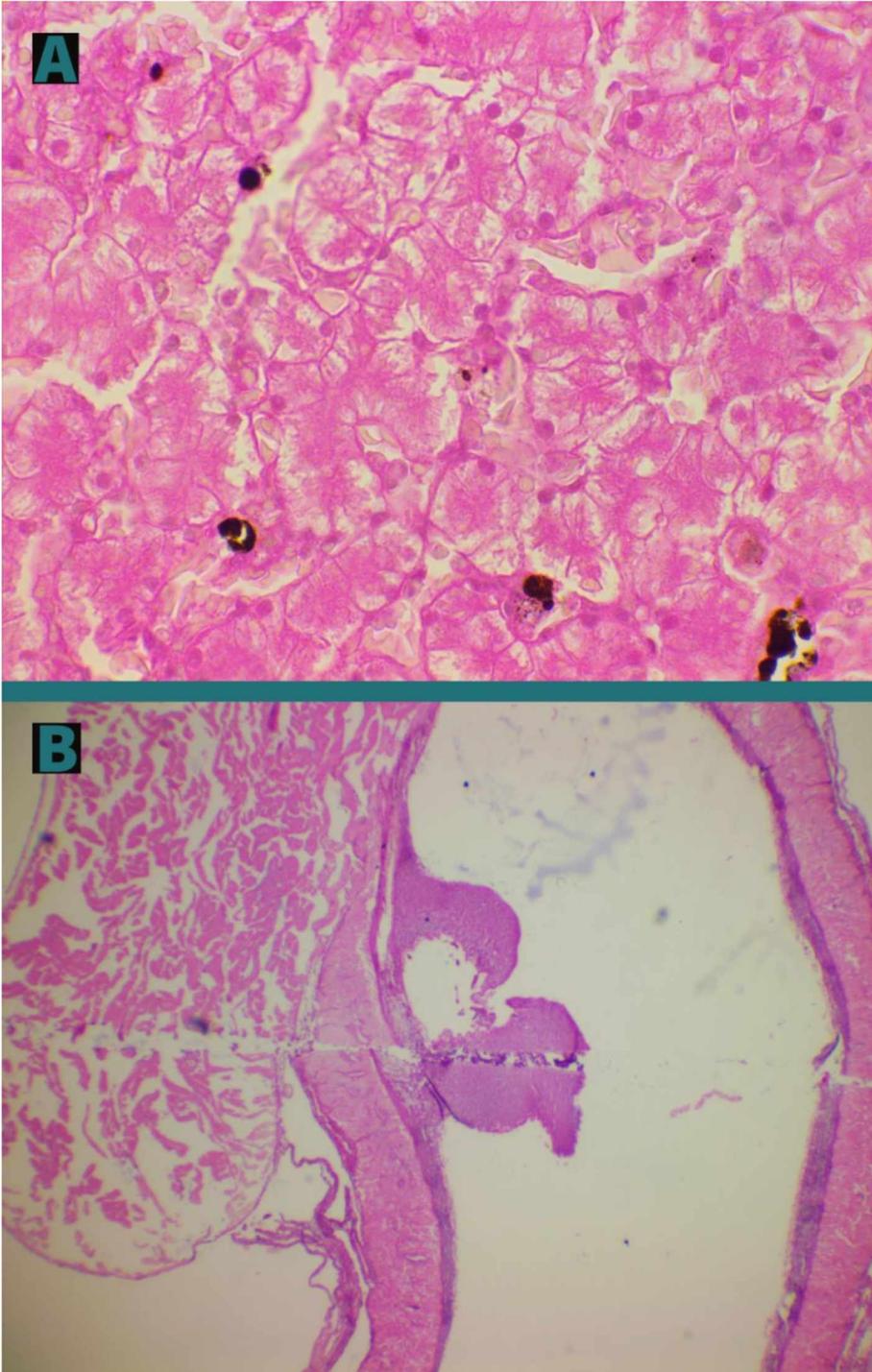


Figure 5. Photomicrograph of.Fragment of liver showing enlarged hepatocytes, with peripheral nucleus and cloudy cytoplasm, with indistinct cytoplasmic limits , compatible with edema. Presence of melanomacrophages in moderate to marked amounts(A). Photomicrograph of Heart fragment with a marked increase in the spacing between cardiac fibers, characterizing edema. Presence of mononuclear inflammatory cells in a marked amount in the pericardium region and a rare amount of intermingling with cardiac fibers. We noticed a vascular structure containing adhered to the wall, in tunica intima, a structure consisting of cell debris, fibrin and basophilic granular structures suggestive of bacterial colonies, characterizing thrombus(B).

A total of 26 isolates were classified as Gram positive cocci, catalases and oxidases negative, in MALDIT -TOF were identified as *S. agalactiae*, and serotype Ib, according to Capsular serotyping.

3.2 MLST

In MLST was founded absence of amplification of *glcK* gene for all the isolates, the other 6 genes showed the same allelic profile: *adhP*: 52, *pheS*: 17, *atr*: 31, *glnA*: 4, *sdhA*: 26 and *tkt*: 19. Because of the absence of *glcK* gene, it's impossible to characterize ST, considering non-typeable strains.

4.DISCUSSION

This is the first report of *S. agalactiae* causing outbreaks in bullfrogs in Brazil. Studies with infectious diseases in bullfrogs were poor and it difficult the development of sanitary strategies and better comprehension of the pathogens. Previous studies showed *Streptococcus* spp. causing similar clinical signs of this relate, high stockage density and stress like were presented like possible causes of the outbreaks.(Amborski et al. 1983, Pilarski & Schocken-Iturrino 2010). Lethargy, ascites, incoordination, erratic swim, corneal opacity and discreet petechiae in posterior members were the symptoms founded.

In Australia, at infections by *S. agalactiae* ST261 in rays, was possible to identify mononuclear infiltrate cells and granulocytes in minority, at heart fragment, what reinforces the idea of a septicemic disease. (Bowater et al. 2018). Meningitis and mononuclear infiltrate were founded in Rays, groupers and now in Bullfrog, that continues to reinforce the capacity of attack against nervous system (Bowater et al. 2012, 2018). Melanomacrophages was observed in liver, and Filho et al., 2009 describes this like one of the histopathological finding at the experimental

infection with a strain of *S. agalactiae* in Nile tilapia isolated in Paraná, Brazil, these experiment shows the capacity of causing septicemia meningitis and epicarditis.

MALDI-TOF, was an efficient technique to confirm all the samples as *S. agalactiae*. That technique could be used in routine of diagnosis of *S. agalactiae*, and MALDI-TOF seems to be a good option of fast and effective technologies to give more information about *S. agalactiae*, showing high capacity to process many analysis (Rothen et al. 2019).

MLST is an important tool to study epidemiological sources, host species interaction and geographical distribution of *S. agalactiae*. The non typeable(NT) profile, founded at this study was described in states of central-south region of Brazil causing diseases in Tilapia (*Oreochromis* spp.)(Barony et al. 2017). The cross infection between tilapia and bullfrog is a risk to both production, because these cultures happens in Brazil on correlated areas, so the characterization of the disease and the pathogen is important to develop efficient health management researches.

Most of tilapia isolates of *S. agalactiae* identified in Brazil was belonging to the Clonal Complex 260 (CC260) or the group of ST's 257, 552 and NT (Godoy et al. 2013, Barony et al. 2017). In Australia, samples of *S. agalactiae* ST261, founded in salt water species of fish like rays and grouper fishes, probably have origins with an importation of tilapia (*Oreochromis* spp.)(Bowater et al. 2012, 2018, Kawasaki et al. 2018) . Considering ST's 260, 261 and 552, pathogens specifics of aquatic organisms, is noted a process of genome reduction comparing to terrestrial hosts, and this is associated with the adaptability of these strains (Delannoy et al. 2013, Kawasaki et al. 2018). Correlating this facility to adapt to aquatic hosts and the occurrence of the NT samples in tilapia on Brazilian southeast, it is probably that the *S. agalactiae* NT founded causing disease in bullfrog was carried by the free tilapia founded at the water source of the farm.

There are many studies with *S. agalactiae* in tilapia developing vaccine to control and prevent outbreaks.(Liu et al. 2016, Delphino et al. 2019). Describe the disease, the pathogen and standardize experimental infection model is the first step to future studies with vaccines, antibiotic tests, diets and another researches that involves the interaction between bullfrogs and *S.agalactiae*, an important pathogen in Brazilian aquaculture.

5.CONCLUSION

This is the first report of *Streptococcus agalactiae* (serotype Ib, non-typeable strains) causing disease in bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). The present characterization of the infection caused by *S. agalactiae* in bullfrogs have fundamental importance to the development of future researches for control and prevention of streptococosis in bullfrog farms.

6.AKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

LITERATURE CITED

- Amborski RL, Snider TG, Thune RL, Culley DD (1983) A non-hemolytic, group B *Streptococcus* infection of cultured bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in Brazil. J Wildl Dis 19:180–184.
- Assis GBN, Pereira FL, Zegarra AU, Tavares GC, Leal CA, Figueiredo HCP (2017) Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the fast identification of gram-positive fish pathogens. Front Microbiol 8.
- Barony GM, Tavares GC, Pereira FL, Carvalho AF, Fernanda A, Leal CAG, Figueiredo HCP

- (2017) Large-scale genomic analyses reveal the population structure and evolutionary trends of *Streptococcus agalactiae* strains in Brazilian fish farms. *Sci Rep*:1–10.
- Bowater RO, Anderson IG, Condon K, Robinson B, Kong F, Reynolds A, Hyland S, Mcpherson G, Blyde D (2012) Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper , *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern. *J Fish Dis* 35:173–186.
- Bowater RO, Dennis MM, Blyde D, Stone B, Barnes AC, Delamare-Deboutteville J, Horton MA, White M, Condon K, Jones R (2018) Epizootics of *Streptococcus agalactiae* infection in captive rays from Queensland, Australia. *J Fish Dis* 41:223–232.
- Chideroli RT, Amoroso N, Mainardi RM, Suphoronski SA, de Padua SB, Alfieri AF, Alfieri AA, Mosela M, Moralez ATP, de Oliveira AG, Zanol R, Di Santis GW, Pereira UP (2017) Emergence of a new multidrug-resistant and highly virulent serotype of *Streptococcus agalactiae* in fish farms from Brazil. *Aquaculture* 479:45–51.
- Cribb AY, Afonso AM, Mostério CMF (2013) Manual Técnico de Ranicultura.
- Delannoy CMJ, Crumlish M, Fontaine MC, Pollock J, Foster G, Dagleish MP, Turnbull JF, Zadoks RN (2013) Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC Microbiol* 13.
- Delphino MKVC, Barone RSC, Leal CAG, Figueiredo HCP, Gardner IA, Gonçalves VSP (2019) Economic appraisal of vaccination against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia farms in Brazil. *Prev Vet Med* 162:131–135.
- Fagundes LC, Eto SF, Marcusso PF, Fernandes DC, Marinho-Neto FA, Claudiano GS, Moraes JRE, Moraes FR, Loyola W, Freitas JC, Salvador R (2016) Transferência passiva de soro hiperimune anti-*Streptococcus agalactiae* e seu efeito profilático em tilápias-do-nilo infectadas experimentalmente: Sobrevivência e títulos de anticorpos. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 68:379–386.

- Filho CI, Müller EE, Pretto-giordano LG, Bracarense APFRL (2009) Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Brazilian J Vet Pathol 2:12–15.
- Godoy DT, Carvalho-Castro GA, Leal CAG, Pereira UP, Leite RC, Figueiredo HCP (2013) Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. Lett Appl Microbiol 57:476–483.
- Iregui CA, Comas J, Vásquez GM, Verján N (2016) Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. J Fish Dis 39:205–215.
- Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan MS, Kunst F, Glaser P, Rusniok C, Crook DWM, Harding RM, Bisharat N, Spratt BG (2003) Multilocus sequence typing system for group B *streptococcus*. J Clin Microbiol 41:2530–2536.
- Kawasaki M, Delamare-Deboutteville J, Bowater RO, Walker MJ, Beatson S, Ben Zakour NL, Barnes AC (2018) Microevolution of *Streptococcus agalactiae* ST-261 from Australia indicates dissemination via imported tilapia and ongoing adaptation to marine hosts or environment. Appl Environ Microbiol 84:1–17.
- Leal CAG, Queiroz GA, Pereira FL, Tavares GC, Figueiredo HCP (2019) *Streptococcus agalactiae* Sequence Type 283 in Farmed Fish, Brazil. Emerg Infect Dis 25:98–101.
- Liu G, Zhu J, Chen K, Gao T, Yao H, Liu Y, Zhang W, Lu C (2016) Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia. Dis Aquat Organ 122:163–170.
- Mello SCRP, De Oliveira RR, Pereira MM, Rodrigues E, Silva WN, De Seixas Filho JT (2016) Development of a water recirculating system for bullfrog production: Technological innovation for small farmers. Cienc e Agrotecnologia 40:67–75.
- Nascimento L de S, Dias GEAm, Filho JTS, Mello SCRP, Filho OPR, Pereira MM (2019) Rendimento de carcaça de machos e fêmeas da rã-touro em diferentes sistemas de recria e em fase reprodutiva. Rev Bras Agropecuária Sustentável:102–109.

- Oliveira CR, Alfaia SR, Ikari FL, Tavares LS, Sousa RLM de, Harakava R, Ferreira CM (2020) Detection and molecular characterization of Frog virus 3 in bullfrogs from frog farms in Brazil. *Aquaculture* 516.
- Peres LR da S (2018) AVALIAÇÃO BIÓTICA E ABIÓTICA DE UM “ WETLAND ” EM EFLUENTE DE RANICULTURA. UNESP- Jaboticabal
- Pilarski F, Schocken-Iturrino RP (2010) Isolamento e resistência a antimicrobianos de cepas de *Streptococcus* spp. provenientes de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*). *Arq Bras Med Vet e Zootec* 62:1275–1279.
- Rothen J, Pothier JF, Foucault F, Blom J, Nanayakkara D, Li C, Ip M, Tanner M, Vogel G, Pflüger V, Daubenberger CA (2019) Subspecies Typing of *Streptococcus agalactiae* Based on Ribosomal Subunit Protein Mass Variation by MALDI-TOF MS. *Front Microbiol* 10:1–13.
- da Silva GR, Ferreira ALM, da Silva MR, de Paiva VV (2020) CONSIDERAÇÕES SOBRE AS PRINCIPAIS DOENÇAS EMERGENTES EM RÃS TOURO AMERICANA (*Lithobates catesbeianus*) EM SISTEMAS DE CRIAÇÃO INTENSIVO. 530–543.

ANEXO A – NORMAS DO CAPITULO 2

Conforme previamente indicado pelo PPG-FAMEV-UFU, seguem os link das normas da revista Diseases of Aquatic Organisms (DAO) a qual o artigo do capítulo 2 será submetido.

<https://dao.manuscriptmanager.net/sLib/v4/authguide.php>

<https://www.int-res.com/journals/guidelines-for-authors/guidelines-authors#tab3box>

<https://www.int-res.com/journals/guidelines-for-authors/guidelines-authors#tab4box>