

ISOLAMENTO DE *Aeromonas hydrophila* EM *Bettas splendens* – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NAS BRÂNQUIAS

Cláucia Aparecida Honorato¹
 Thiago Leite Fraga¹
 Camila Aparecida Nascimento¹
 Natália Farias da Silva¹

HONORATO, C. A.; FRAGA, T. L.; NASCIMENTO, C. A.; SILVA, N. F. da. Isolamento de *Aeromonas hydrophila* em *Bettas splendens* – alterações histopatológicas nas brânquias. **Arq. Ciênc. Vet.Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 17, n. 1, p. 49-53, jan./mar. 2014.

RESUMO: O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar *Aeromonas hydrophila*, causadora de mortalidade em peixes descrever as alterações histopatológicas provocadas nas brânquias de machos de beta *Bettas splendens*. Foram utilizados dez peixes que apresentavam característica de alteração de comportamento como anorexia, letalidade e apatia. Amostras de água, muco e brânquias foram inoculadas em meio de cultura Agar sangue a 25°C por 48 horas. Foi caracterizado *A. hidrófila* como principal causa do surto de mortalidade. Foram observadas alterações histopatológicas nas brânquias desde fusão lamelar secundária e necrose do tecido. *A. hidrophila* prejudica o órgão respiratório de forma irreversível, comprometendo as trocas gasosas levando o peixe ao óbito.

PALAVRA CHAVE: Infecção. Histopatologia. Peixes ornamentais.

ISOLATION OF *Aeromonas hydrophila* IN *Bettas splendens* - HISTOPATHOLOGIC CHANGES IN GILLS

ABSTRACT: The objective of this study was to isolate and characterize *Aeromonas hydrophila*, a cause of mortality, and to describe the histopathological changes caused in the gills of *Bettas splendens*. Ten fish presenting change behavior such as anorexia, lethality and apathy were used in this study. Water, mucus and gill samples were inoculated in blood agar culture medium at 25°C for 48 hours. *Aeromonas hydrophila* was characterized as the main cause of mortality outbreak. Histopathological changes were observed in the gills, from secondary lamellar fusion to tissue necrosis. *A. hidrophila* irreversibly harms the respiratory organ, compromising the gaseous exchanges, which leads to the death of the fish.

KEYWORDS: Infection. Histopathology. Ornamental fish.

AISLAMIENTO DE *Aeromonas hydrophila* EN *Bettas splendens* - ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN LAS BRANQUIAS

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar *Aeromonas hydrophila*, causante de mortalidad en peces, y describir las alteraciones histopatológicas causadas en las branquias de machos de beta *Bettas splendens*. Se utilizó 10 peces que presentaban características de cambio de comportamiento como anorexia, mortalidad y apatía. Las muestras de agua, moco y branquias fueron inoculadas en medio de cultivo Agar sangre a 25° C durante 48 horas. Fue caracterizado *A. hidrófila* como principal causa del surto de mortalidad. Se ha observado cambios histopatológicos en las branquias, desde fusión lamelar secundaria y necrosis de los tejidos. *A. hidrophila* compromete el órgano respiratorio de forma irreversible, comprometiendo los cambios gaseosos y llevando los peces a la muerte.

PALABRAS CLAVE: Infección. Histopatología. Peces ornamentales.

Introdução

A produção de peixes ornamentais é uma modalidade da aquicultura em plena expansão nas últimas décadas. Nos Estados Unidos, a popularidade e os altos valores de venda têm situado a produção de peixes ornamentais entre as principais fontes de renda da aquicultura. No comércio internacional de organismos aquáticos ornamentais, observa-se aumento anual a uma taxa média de 14%, chegando a cifras superiores a 200 milhões de dólares por ano para as exportações (LIMA; BERNARDINO; PROENÇA et al., 2001).

O peixe *Beta*, também conhecido como "peixe de briga", pertence à subordem anabantoidei (Integrated Taxonomic Information System – ITIS, 2006). É originário da Ásia, sendo seu habitat natural as regiões alagadiças com águas

estagnadas e pobres em oxigênio, como brejos, pântanos e campos de plantação de arroz. Atualmente, no Brasil, além do aquarismo convencional, essa espécie tem sido utilizada como controle biológico de mosquitos, como os das espécies *Aedes aegypti* no Ceará, e o da *Culex quinquefasciatus* em Pernambuco (PAMPLONA; LIMA; CUNHA et al., 2004).

Devido ao aumento da demanda por esta espécie de peixes ornamentais, a intensificação do cultivo é inevitável e por isso, o aumento do risco de surgimento de doenças em pisciculturas intensivas.

As bactérias do gênero *Aeromonas* têm assumido, nos últimos anos, uma maior importância nos diagnósticos de doenças de peixes, muitas vezes aparecendo como agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes de água doce (HIRST et al., 2006), acar-

DOI: <https://doi.org/10.25110/arqvet.v17i1.2014.4917>

¹Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN), Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Hospital Veterinário, Rua Balbina de Matos, 2121 – Jd. Universitário CEP 79.824-900 – Dourados/MS. clauciahonorato@yahoo.com.br

retando perdas na produção (MOURINHO *et al.*, 2006). A ocorrência de *Aeromonas* na criação de espécies aquáticas pode provocar morbidade e letalidade no sistema de produção (KADLEC *et al.*, 2011). As lesões provocadas por agentes agressores como bacteriose e parasitas como as promovidas por infecções com *Aeromonas* podem comprometer as funções de diferentes órgãos (VELLOSO *et al.*, 2012).

As bactérias do gênero *Aeromonas* podem ser encontradas no solo, água doce e salgada, água clorada e fezes de animais, sendo seu surgimento como patógenos primários relacionados a uma grande variedade de infecções locais e sistêmicas, mesmo em indivíduos imunologicamente competentes (MARTINELLI, 2011). Os sinais clínicos observados pela *Aeromonas hydrophila* são perda de apetite, apatia, perda de equilíbrio, lesões epidérmicas como despigmentação, necroses da pele, úlceras com exposição da musculatura e alterações no comportamento (JATOBÁ *et al.*, 2012).

Este trabalho teve como objetivo confirmar a presença de *Aeromonas hydrophila*, e caracterizar histologicamente seus efeitos nas brânquias de machos de beta *Betta splendens*.

Relato de caso

Foram separados 10 peixes betas que apresentavam características de alteração de comportamento como anorexia, letalidade e apatia durante o surto de mortalidade ocorridos no laboratório de produção animal do Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN, Dourados, Mato Grosso do Sul. Os peixes encontravam-se alojados individualmente em aquários de três litros mantidos em laboratório aquecido a 27°C e fotoperíodo de 12 horas de luz.

Foram coletados amostras de água dos aquários, os peixes foram eutanasiados por dessensibilização por hipotermia, posteriormente coletados amostras de muco e brânquias. Essas foram inoculadas em meios de cultura ágar sangue e incubadas a 28°C, por 48 horas (POPOFF, 1984) e em seguida, visualizado presença de hemólise. Os testes bioquímicos realizados foram: ferro três açúcares (TSI), para verificar a produção de ácido sulfídrico (H₂S) a partir de tiosulfato; citrato de Simmon (SIMMONS, 1926), urease (CHRISTENSEN, 1949), arginina, lisina, ornitina, produção de indol, vermelho de metila (MR), produção de acetilmetilcarbinol, pelo teste de Voges-Proskauer (VP) (EDDY, 1961), hidrólise de gelatina (LEVINE; CARPENTER, 1923) e esculina. Realizou-se também teste para catalase (3% H₂O₂), oxidase e motilidade.

Para análises histológicas, fragmentos de brânquias dos betas foram fixados em solução formalina tamponada (0,1M; pH 7,3), por 24 horas e depois lavados em álcool 70% até o processamento. Posteriormente foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina com polímero plástico Histosec (Merck®). Realizou-se a microtomia com cortes de 2 a 5 µm de espessura, que foram posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina.

Resultados e Discussão

Os principais sinais clínicos observados por meio da análise macroscópica de órgãos externos (pele e nadadeiras) foram presença de manchas ou despigmentação na pele,

petequias e sufusões hemorrágicas na superfície do corpo, nadadeiras com erosões hemorrágicas e corroídas (desfiadas/necrosadas) com congestão e aumento da cavidade abdominal contendo líquido transparente e límpido (Figura 1).

Esta descrição é comumente observada em casos de infecções bacterianas (GARCIA; MORAES, 2009). Em peixes com ocorrência de *A. hydrophila* os sinais clínicos de perda de apetite, apatia, perda de equilíbrio, lesões epidérmicas como despigmentação, necroses da pele, úlceras com exposição da musculatura e alterações no comportamento são comumente observados (JATOBÁ *et al.*, 2012).



Figura 1: Beta macho (*Betta splendens*) infectado com *Aeromonas hydrophila*. (Seta) corrosão de nadadeira, (*) descoloração da pele

Isolaram-se colônias com coloração marrom-escuro (HANNINEN; RIDELL; HIRVELA-KOSKI, 1995) de *A. hydrophila* em placas de ágar sangue. Os esfregaços, corados pelo método de Gram, confirmaram a presença de bastonetes Gram-negativos. Foi constatada a presença de beta hemólise em ágar sangue. A análise da água, brânquias e muco dos peixes, submetidas à série bioquímica, caracterizou a bactéria *A. hydrophila* de acordo com os resultados dos testes propostos por Popoff (1984) e Abeyta Júnior *et al.*, (1990) (Tabela 1).

A. hydrophila são consideradas oportunistas mais associados à infecções em organismos aquáticos (JATOBÁ *et al.*, 2012). Os métodos de cultivo intensivo induzem estresse, e os bacilos gram-negativos são os que provocam maior mortalidade (SWAIN *et al.*, 2010). Em jundiás *Rhamdia quelen* inoculados com *A. hydrophila* apresentaram mortalidade de 100% em 24 horas, estando associada à produção de acetilcolinesterase que em grandes quantidades são letais aos peixes (BOIJINK; BRANDÃO, 2001). Na infecção por *A. hydrophila*, os peixes morrem rapidamente, efeito esse que pode variar segundo a resistência dos peixes (AUSTIN, 2010).

Tabela 1: Característica fenotípica de *Aeromonas hidrófila* isolada de Betas macho (*Betta splendens*)

Teste	Água	Brânquias	Muco
Catalase (+)	+	+	+
Indol (+)	+	+	+
Motilidade (+)	+	+	+
Oxidase (+)	+	+	+
Gás (+)	+	+	+
Indol (+)	+	+	+
Manitol	+	+	+
Lisina (-)	-	-	-
Ornitina (-)	-	-	-

Os Betas machos sadios apresentaram aspecto normal, sendo os filamentos subdivididos em lamelas branquiais que encontram-se dispostas perpendicularmente. Os filamentos branquiais possuem um epitélio estratificado, constituído por células de cloreto mucosas e pavimentosas (Figura 2A).

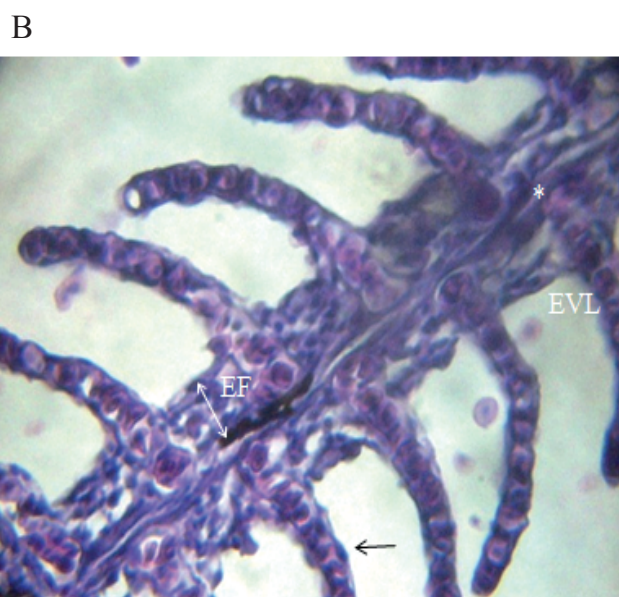
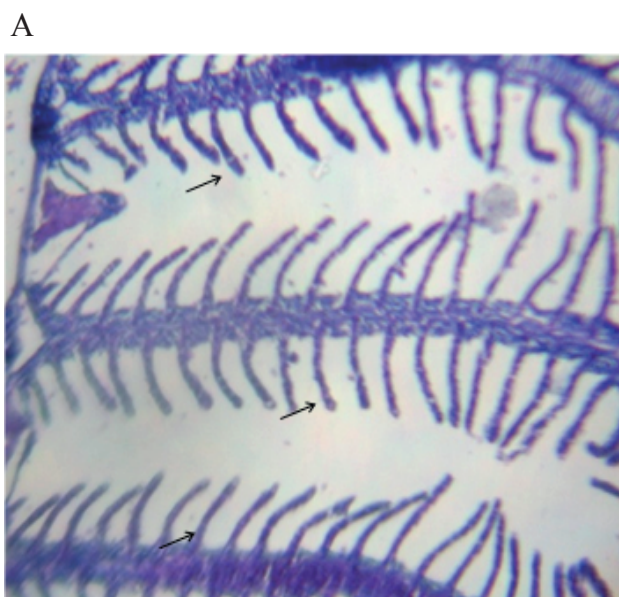


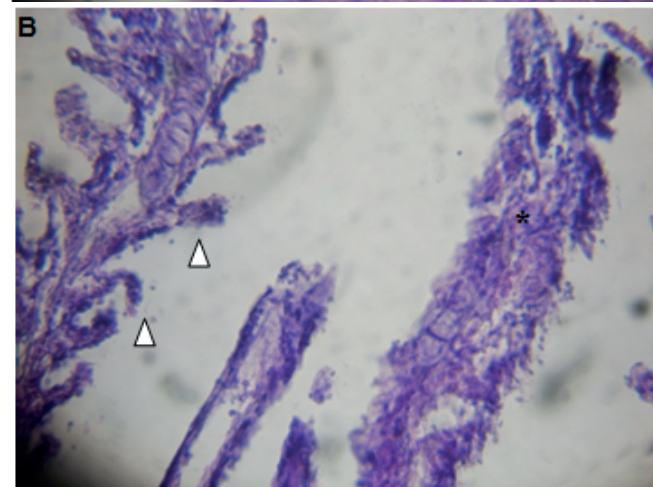
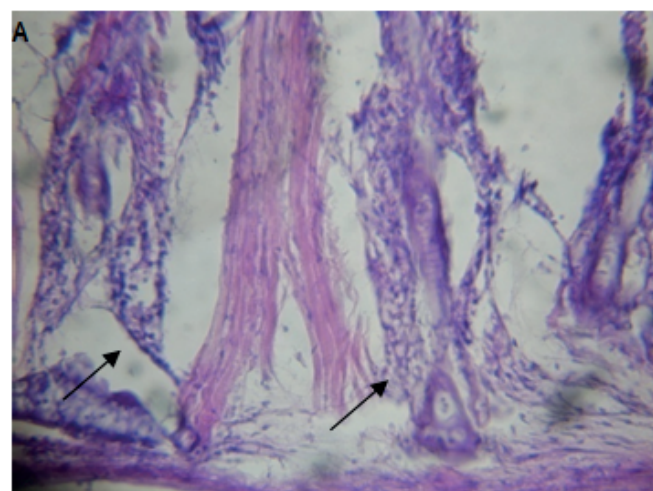
Figura 2: Filamentos brânquias de Betas sadios. A – filamentos brânquias (seta) HE, 200x. B – EF epitélio filamentar; EVL – eixo vascular da lamela, ponta da seta – células pavimentosas; (*) seio venoso central. HE, 400x.

Quando os peixes são expostos algum agente agressor (toxicológico ou parasitário) as brânquias podem apresentar diversas alterações patológicas indicativas de condições desfavoráveis de um ambiente. Observa-se que brânquias de betas saudáveis apresentam arquitetura a qual o epitélio assenta-se sobre o seio venoso central e encontra-se segmentado por eixos vasculares que originam as lamelas. Essas estruturas representam projeções teciduais acima da superfície externa do epitélio filamentar. Desse modo, as lamelas são constituídas centralmente por um eixo vascular e por um epitélio composto por células pavimentosas de revestimento e indiferenciadas. Esse epitélio assenta-se na lâmina basal de

células endoteliais modificadas (células pilar) que suportam e delimitam o compartimento sanguíneo lamelar (Figura 2B).

Já as brânquias dos betas infectados por *A. hidrófila* apresentaram alterações histopatológicas. Foi observado vasodilatação das lamelas que proporcionou ruptura celular com perda na capacidade de suporte das lamelas. Esse tipo de lesão caracterizou-se pela condensação dos núcleos e ruptura das membranas celulares (Figura 3A). Destaca-se a proliferação do epitélio filamentar, vasodilatação do seio venoso central e da região basal do eixovascular das lamelas e no epitéliolamelar edema intersticial (Figura 3 B, D) dos animais infectados. A necrose constituiu outro tipo de lesão observado, a qual foi mais acentuada na base do epitélio filamentar estendendo-se, por vezes, na sua totalidade (Figura 3 B, D). Foi constatada inflamação caracterizada por infiltração leucocitária (Figura 3 B).

A proliferação do epitélio filamentar estendeu-se por toda a área epitelial conduzindo à fusão lamelar (Figura 3 D). As brânquias apresentavam alterações circulatórias caracterizada por hiperemia e aneurisma (Figura 3C). Estas lesões histopatológicas causam danos à integridade morfofuncional da brânquia reduzindo sua eficiência, em realizar as trocas gasosas (SHIOGIRI et al., 2012). Injúrias nos órgãos respiratórios de peixes, comprometendo trocas respiratórias provocadas por parasitos são reportadas para *Paralichthys sorbignyanus* (VELLOSO et al., 2012).



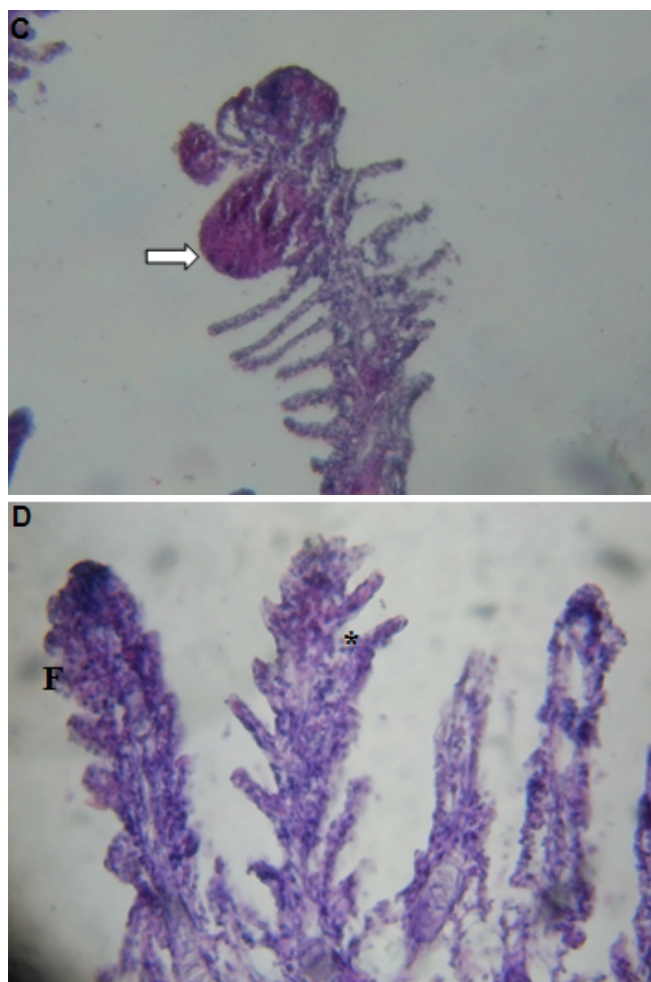


Figura 3: Filamentos brânquias de Betas infectados por *Aeromonas Hydrophila*. A - ruptura de membranas celulares (setas pretas), característicos de necrose. Necrose na base do epitélio filamental HE, 200x. B – Destacamento do epitélio lamelar (cabeça de setas), aneurisma (*) HE, 200x. C - vasodilatação do eixo vascular das lamelas com perda da capacidade de suporte das células pilar e formação de aneurismas (setas) HE, 200x. D - Proliferação generalizada do epitélio filamental com fusão (F) das lamelas branquiais. Edema intersticial (*) HE, 400x.

Conclusão

A bactéria que estava provocando o surto de mortalidade nos peixes betas machos foi identificada como *A. hydrophila*. As alterações histopatológicas descritas são consideradas severas e comprometem o órgão respiratório de forma irreversível.

Agradecimento: Ao Hospital Veterinário da UNIGRAN.

Referências

ABEYTA JÚNIOR, C. et al. Incidence of motile aeromonads from United States West Coast shellfish growing estuaries. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 849-855, 1990.

AUSTIN, B. Vibrios as causal agents of zoonoses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 310-317, 2010.

BOIJINK, C. L.; BRANDÃO, D. A. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 503-507, 2001.

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

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

GARCIA, F.; MORAES, F. R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 17-21, 2009.

HANNINEN, M. L.; RIDELL, J.; HIRVELA-KOSKI, V. Phenotypic and molecular characteristics of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* isolated in Southern and Northern Finland. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, p.12-21, 1995.

HIRST, D.; et al. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência agrotecnológica**, Lavras, v. 30, n. 6, 2006.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATIOS SYSTEM (ITIS). Catalogo fishes. Disponível em: <<http://www.itis.usda.gov>>. Acesso em: 15 mar. 2014.

JATOBÁ, A. et al. Isolamento e caracterização de bactérias hemolíticas de Acará disco e Neon arco-íris. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 763-768, 2012.

KADLEC, K. et al. Applied and environmental microbiology, v. 77, p. 7147-7150, 2011.

LEVINE, M.; CARPENTER, D. C. Gelatin liquefaction by bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 8, p. 297-306, 1923.

LIMA, A. O.; BERNARDINO, G.; PROENÇA, C. E. M. Agronegócio de peixes ornamentais no Brasil e no mundo. **Panorama da Aqüicultura**, v.11, n. 65, p.14-24, 2001.

MARTINELLI, T. M. et al. Estudo epidemiológico das *Aeromonas* spp., através de REP e ERIC-PCR, em abatedouro bovino. Arquivo do Instituto de Biologia, São Paulo, v. 78, n. 4, p. 485-491, 2011.

MOURINHO, J. L. P. et al. Isolamento de *Aeromonas hydrophila* em girinos de rã-touro na metamorfose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p.1325-1327, 2006.

PAMPLONA, G. C.; LIMA, J. W. O.; CUNHA, J. C. L.

Evaluation of the impact on *Aedes aegypti* infestation in cement tanks of the municipal district of Canindé, Ceará, Brazil after using the *Betta splendens* fish as an alternative biological control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, p. 400-404, 2004.

POPOFF, M. GENUS III. AEROMONAS KLUYVER AND VAN NIEL. In: DRIEG, N. R. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, p. 545-548.

SHIOGIRI, N. S. et al. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, p. 388-396, 2012.

SIMMONS, J. S. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolating of certain fungi. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 39, p. 209-241, 1926.

SWAIN, P. et al. Derivation of rough attenuated variants from smooth virulent *Aeromonas hydrophila* and their immunogenicity in fish. **Vaccine**, Amsterdam, v. 28, n. 29, p. 4626-4631, 2010.

VELLOSO, A. L et al. Histopatologia de brânquias de *Paralichthy sorbignyanus* (Teleostei: paralichthyidae) parasitado por *Therodamas fluviatilis* (Copepoda: Ergasilidae). **Atlântica**, Rio Grande, v. 34, n. 1, p. 47-52, 2012.

Recebido em: 30/03/2014

Aceito em: 07/06/2014