

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

***Francisella noatunensis orientalis* EM TILÁPIAS DO**
NILO CULTIVADAS EM TANQUES-REDE NA BACIA DO
RIO ARAGUARI, MG

Mariela Moura Carreon

Médica Veterinária

Mestre em Ciências Veterinárias

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Junho de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

***Francisella noatunensis orientalis* EM TILÁPIAS DO**
NILO CULTIVADAS EM TANQUES-REDE NA BACIA DO
RIO ARAGUARI, MG

Mariela Moura Carreon

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Anna Monteiro Correia Lima

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Augusto de Alcântara Costa

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Junho de 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C314f
2018 Carreon, Mariela Moura, 1986-
Francisella noatunensis subsp. *orientalis* em Tilápias do Nilo
cultivadas em tanques-rede na Bacia do Rio Araguari, Minas Gerais
[recurso eletrônico] / Mariela Moura Carreon. - 2018.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.

Coorientador: Frederico Augusto de Alcântara Costa.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.1054>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Tilápia (Peixe) - Histopatologia. 3. Saúde animal.
4. Granuloma. 5. Francisella. 6. Peixe - Criação - Araguari (MG). I.
Lima, Anna Monteiro Correia (Orient.). II. Costa, Frederico Augusto de
Alcântara (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Rejâne Maria da Silva – CRB6/1925



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



Ata da defesa de **TESE DE DOUTORADO** junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: **TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/011/2018**

Data: 29/06/2018

Discente: **Mariela Moura Carreon** – Matrícula – 11413MEV016

Título da Tese: ***Francisella noatunensis orientalis* EM TILÁPIAS DO NILO CULTIVADAS EM TANQUES-REDE NA BACIA DO RIO ARAGUARI, MG.**

Área de concentração: SAÚDE ANIMAL

Linha de pesquisa: CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA

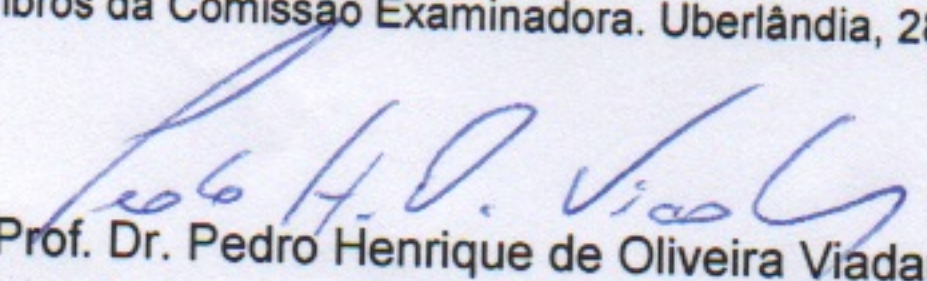
Projeto de Pesquisa de vinculação: ESTUDOS DE EPIDEMIOLOGIA, DE NOVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO DE DOENÇAS BACTERIANAS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SELVAGENS

Aos 29 dias do mês de junho do ano de 2018 às 08:00 horas na sala 2D54 – Bloco 2D – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores/Doutores: **Pedro Henrique de Oliveira Viadanna** – FACULDADE PRESIDENTE ANTONIO CARLOS DE UBERLÂNDIA; **Líria Queiroz Luz Hirano** – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA; **Fernanda Raghianti** – INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO; **Miguel Frederico Fernandez Alarcon** – PREVET LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO E SANIDADE AQUÍCOLA e **Anna Monteiro Correia Lima** orientador(a) do(a) candidato(a).

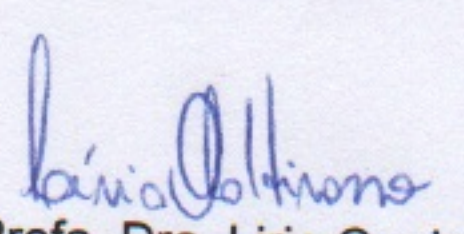
Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Anna Monteiro Correia Lima concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) APROVADA.


Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Os trabalhos foram encerrados às 11 horas e 40 minutos, e para constar, lavrou-se a presente ata que será assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 28 de junho de 2018.

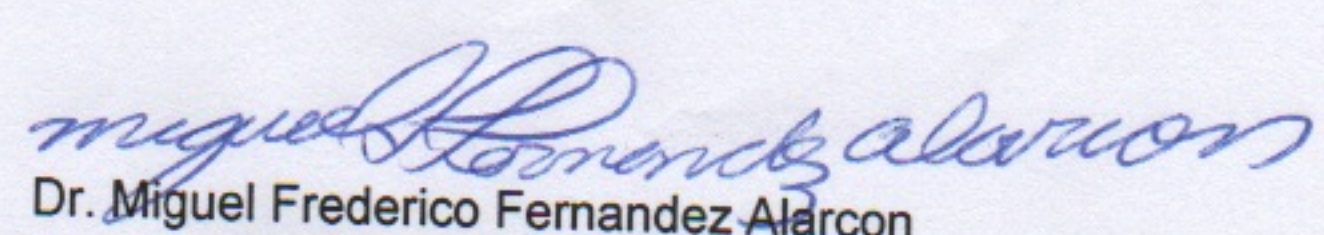

Prof. Dr. Pedro Henrique de Oliveira Viadanna

FACULDADE PRESIDENTE ANTONIO CARLOS DE UBERLÂNDIA

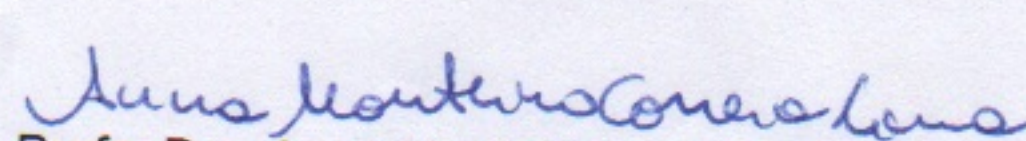

Profa. Dra. Líria Queiroz Luz Hirano
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA


Profa. Dra. Fernanda Raghianti

INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO


Dr. Miguel Frederico Fernandez Alarcon

PREVET LAB. DE DIAGNOST. E SANIDADE AQUÍCOLA


Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima

ORIENTADORA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIELA MOURA CARREON – Nascida em Uberlândia, Minas Gerais, em 14 de junho de 1986, filha de Daniel de Sousa Moura e Solange Maria da Silva Sousa, irmã de Daniela Moura Mascarenhas e casada com Rafael Silveira Carreon. Médica Veterinária, graduada em Janeiro de 2011 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) por um período de um ano (2006-2007), representante de sala e presidente da Comissão de Formatura. Em 2011 iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Produção Animal, na qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por dois anos (2011-2013) e, no mesmo período, foi representante discente no Conselho de Pós-Graduação. Em Julho de 2014 iniciou o Doutorado, no mesmo Programa de Pós-Graduação, na área de concentração em Saúde Animal, na qual foi selecionada para obtenção de bolsa de estudo, entretanto, abdicou-a devido às normas do Programa e à incompatibilidade com o trabalho profissional. Atualmente é professora nos cursos de Medicina Veterinária das instituições Fundação Presidente Antônio Carlos (UNIPAC) e Centro Universitário do Triângulo (UNITRI), ministrando as disciplinas de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (Carnes, Leite, Ovos e Mel) e Ética e Bem-Estar Animal. É membro do Comitê de Ética Animal do Centro Universitário do Triângulo (UNITRI) desde Janeiro de 2017. É também sócia-proprietária da Marmoreio Carnes Especiais, em Uberlândia, no qual atua como Responsável Técnica e diretamente no controle de qualidade desde as compras dos animais, manejo no confinamento, abate no frigorífico e a produção das carnes.

“Nada é mais bonito que agradecer... Perceber que Deus nos presenteia é saber o quão a vida é maravilhosa; Independente dos ‘nãos’, dos acasos e dos tropeços; Independente de tudo o que atrapalha o nosso riso; Agradecer é só uma questão de percepção; Olhar ao redor e perceber os detalhes divinos que Ele coloca no nosso caminho, reconhecer os milagres diários e entender que a gente pode ser feliz o tempo todo com tudo o que a gente já tem.”

Monalisa Macedo

AGRADECIMENTOS

Gratidão! É o sentimento que, hoje, não há palavras para descrever o que sinto! Agradeço primeiramente a Deus e aos amigos espirituais por estarem tão presentes em minha vida e me conduzirem até aqui. Não foi nada fácil, duelar comigo mesmo, em vários momentos, dentro desses quatro anos de Doutorado. As dificuldades e motivos para desistir não faltaram! Obstáculos que sozinhos, pareceram simples de serem resolvidos, mas somatizando com o contexto e situações em que me deparei, a desistência teria sido o caminho mais fácil. Mas não! Graças ao bom Pai, algumas pessoas apareceram no meu caminho, simplesmente para tornar essa trajetória mais branda! Ah, e quanto eu tenho a agradecer a estas pessoas! Sem dúvidas, o que eu escrever aqui, será pouco pelo sentimento de gratidão que tenho por elas!

Começo pelos meus pais, Solange Maria da Silva Sousa e Daniel de Sousa Moura, que nunca mediram esforços para me mostrar a importância do estudo e, que sem dúvidas, se eu não tivesse aprendido, não estaria aqui escrevendo esses agradecimentos. Exemplos de batalhadores que sempre me incentivaram a “caminhar com minhas próprias pernas” em busca do melhor para minha vida! Obrigada pelos conselhos e o amor de sempre!

À minha irmã Dani, cunhado Guto e meus sobrinhos Arthur e Henrique, família Moura Mascarenhas, que mesmo de longe, nunca se fizeram ausentes! Participaram de cada etapa, como se estivessem aqui comigo, torcendo para que tudo desse certo! Obrigada pelos conselhos, ensinamentos e incentivos nos momentos em que eu mais precisei!

Ao meu esposo, Rafael Carreon, que me conforta tanto com seu jeito racional de ser e me faz enxergar a vida de forma mais sensata e simples de ser resolvida. Seu caráter e honestidade são exemplos para que meu dia-a-dia seja cada vez mais justo comigo e com o próximo. Obrigada pelo amor e o companheirismo que nos une cada vez mais! É muito bom caminharmos juntos!

À professora Dr^a Anna Monteiro Correia Lima, que desde a graduação tem se mostrado uma “mãezona”, muito mais do que uma simples orientadora.

Sou grata pela confiança depositada, por me acolher como orientada e permitir que eu pudesse concretizar esse sonho. Foram várias reuniões que a princípio eram de caráter profissional, mas que por fim, se tornavam uma sessão de terapia e incentivos vindos por parte dela. Anna foi peça chave para não deixar esse sonho se interromper. Obrigada por ser tão gentil e compreensiva com seus alunos, sabendo que por trás daquele aluno, seja de graduação ou de pós-graduação, há pessoas que enfrentam de tudo e lutam para estar ali. São professores como você que me motiva a ser cada vez melhor nessa área acadêmica.

Ao professor Dr. Frederico A. A. Costa, meu coorientador, pela preocupação com a aplicabilidade da pesquisa na prática, sempre visando o produtor e os profissionais a campo. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e considerações durante este estudo.

Como eu já disse, sem dúvidas, Deus colocou pessoas no meu caminho, que só vieram para me acrescentar e ajudar nesta jornada! Duas delas foram o Dr. Pedro Henrique de Oliveira Viadanna e a Dr^a. Líria Queiroz Luz Hirano. Os dois eu já os conhecia de bons anos atrás, mas só agora, depois de tantos obstáculos, tive a oportunidade de saber o quanto eles têm a alma boa! Pedro, eternamente serei grata por tanto empenho, incentivos e por não ter medido esforços para me ajudar neste doutorado. Desejo do fundo do meu coração que você tenha uma vida profissional repleta de sucesso, você merece muito! Líria, obrigada por me ensinar e incentivar a colocar em prática os princípios de ética e bem estar animal, me instruindo da melhor forma possível a fazer a eutanásia dos peixes de forma correta. Obrigada pelos conselhos e pelo otimismo que nos contagia! O mundo precisa de pessoas desprendidas e que ajam sem interesses pessoais, como vocês!

A professora Dr^a Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi, que desde a graduação, tenho admiração pela profissional e pessoa que é. Faz parte do grupo de professores que tenho guardado como exemplo. Obrigada pelas contribuições durante a qualificação e pela disponibilidade de participar da banca examinadora.

Ao Dr. Miguel Frederico Fernandez Alarcon, que apareceu nesta jornada por intermédio do Pedro Henrique, e só tenho a agradecer pelo empenho e dedicação em executar parte deste estudo, juntamente com a equipe da PREVET, em Jaboticabal. Obrigada por me esclarecer tão bem o protocolo utilizado, por me trazer boas notícias com os resultados e pela disponibilidade de participar da banca examinadora.

A Dr^a Fernanda Raghianti, que sem a conhecer pessoalmente, já contribuiu e muito neste estudo, com as pesquisas realizadas e publicadas na área. Sua pesquisa na região me incentivou a dar continuidade neste estudo. Muito obrigada pela contribuição e disponibilidade de participar da banca examinadora.

Ao amigo Danilo Guedes Junqueira Junior, companheiro de doutorado e que foi responsável pela parte estatística deste estudo. Muito obrigada pelo companheirismo nesta jornada!

Ao técnico do Laboratório de Histopatologia Animal, Igor de Castro, o meu agradecimento pela elaboração das lâminas para execução do estudo histopatológico dos peixes.

Ao Gustavo e Magnus, que contribuíram para que eu pudesse coletar os peixes para a execução deste estudo.

Aos amigos do Ladoc, que participaram juntos de várias etapas deste estudo e de outros, muitas vezes me apoiando e incentivando a continuar sempre.

Agradeço também a alguns amigos que de certa forma, estiveram presentes ao longo destes quatro anos, sejam contribuindo para meu crescimento profissional ou pessoal: Héli da Leão, Patrícia Alves, João Paulo Bueno, Thalita Rocha e Cybele Emília. Aos tantos outros amigos, que foram meu suporte pessoal, muitas vezes ouvindo meus desabafos, sem mesmo saberem nada da área de Veterinária, minha gratidão por ter vocês em minha vida!

O meu eterno respeito pelos animais, que são o motivo da minha escolha profissional e que tanto me transformam pessoalmente.

Enfim, agora, olhando para trás, entendo o porquê que todas as vezes que pedi forças e sabedoria a Deus, Ele me deu dificuldades e problemas para resolver... eu não recebi nada do que pedi mas recebi tudo o que eu precisava pra hoje poder dizer: venci a mim mesmo, eu não desisti.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE FIGURAS..... | |
| LISTA DE TABELAS..... | |
| RESUMO..... | |
| ABSTRACT..... | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 19 |
| 2.1. Produção e Consumo de Tilápias..... | 19 |
| 2.2. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i> , Linnaeus, 1758).. | 21 |
| 2.3. <i>Francisella</i> spp. (Franciselose)..... | 22 |
| 2.3.1. Diagnóstico e Controle..... | 23 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 26 |
| 3.1. Coleta de Amostras..... | 26 |
| 3.2. Histopatológico..... | 28 |
| 3.3. Diagnóstico Molecular..... | 29 |
| 3.4. Análise Estatística..... | 30 |
| 4. RESULTADOS..... | 31 |
| 4.1. Histopatológico..... | 31 |
| 4.2. Diagnóstico Molecular por PCR..... | 35 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 40 |
| 5.1. Avaliação Anatomopatológica e Histopatológica..... | 40 |
| 5.2. Diagnóstico Molecular por PCR..... | 43 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 49 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 50 |
| REFERÊNCIAS..... | 51 |
| ANEXO 1..... | 67 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Produção anual de tilápias no Brasil, por estado..... | 20 |
| Figura 2. | Localização aproximada das pisciculturas A, B, C e D pertencentes a Bacia do Rio Araguari, localizado no estado de Minas Gerais, Brasil..... | 26 |
| Figura 3. | Piscicultura A, ilustrando os tanques-rede onde as tilápias são produzidas..... | 27 |
| Figura 4. | A: Vista lateral de tilápia com úlcera na pele e nódulos brancacentos no baço e rim (seta preta). B: Fotomicrografia de baço de tilápia, com múltiplos focos granulomatosos, caracterizando esplenite granulomatosa grave, (4x). Hematoxilina e eosina (HE). C: Fotomicrografia de baço de tilápia, Granuloma, (40x). (HE)..... | 32 |
| Figura 5. | A: Fotomicrografia de rim de tilápia com focos de granuloma, caracterizando nefrite granulomatosa moderada, (4x). (HE). B: Fotomicrografia de rim de tilápia com edema peritubular, hemorragia e degeneração hialina (10x). (HE). C: Fotomicrografia de rim de tilápia com edema peritubular, hemorragia e degeneração hialina (40x). (HE). D: Fotomicrografia de fígado de tilápia com granuloma (10x). (HE). E: Fotomicrografia de fígado de tilápia com vasos congestos, edema e processo inflamatório leve (40x). (HE). F: Degeneração hidrópica em fígado de tilápia (40x). (HE)..... | 35 |
| Figura 6. | Resultados de detecção de Fno por PCR em tilápias. A: Gel de eletroforese de PCR demonstrando a presença de <i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>orientalis</i> em todos os fragmentos de baço analisados entre as tilápias A7, A10, A1, C13, A2, A3, A12, C5, C9, A11, Amostra 11: Controle positivo; Amostra 12: Controle negativo, Bp: pares de bases. | |

B: Gel de eletroforese de PCR demonstrando a presença de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em todos os fragmentos de baço analisados entre as tilápias C18, C17, D12, D14, D13, D9, C7, C15, D7, B3; Amostra 11: Controle positivo; Amostra 12: Controle negativo, Bp: pares de bases.

C: Gel de PCR demonstrando a presença de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em todos os fragmentos de baço analisados entre as tilápias D10, D6, C10, D3, C12, A9, D2, D11, C8, C11; Amostra 11: Controle positivo; Amostra 12: Controle negativo; Bp: pares de bases.

D: Gel de PCR demonstrando a presença de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em todos os fragmentos de baço analisados entre as tilápias D4, C15, C19, C16, D5, D8, D1, A6, A4, C5; Amostra 11: Controle positivo; Amostra 12: Controle negativo; Bp: pares de bases..... 36

Figura 7. Gel de PCR demonstrando a presença de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em todos os fragmentos de baço analisados entre as tilápias A5, B2, C4, D15, B1, B4, C1, C2, C3; Tilápia A8: negativo; Amostra 11: Controle positivo; Amostra 12: Controle negativo; Bp: pares de bases..... 37

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1. | Número de tilápias coletadas para histopatológico e para identificação molecular por PCR, por piscicultura..... | 27 |
| Tabela 2. | <i>Primers</i> usados na reação de PCR para detecção de <i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>orientalis</i> em baço de tilápias..... | 30 |
| Tabela 3. | Alterações histopatológicas no baço de 64 tilápias com sintomatologia clínica, Uberlândia, 2018..... | 33 |
| Tabela 4. | Alterações histopatológicas em rim de 64 tilápias com sintomatologia clínica, Uberlândia, 2018..... | 33 |
| Tabela 5. | Alterações histopatológicas no fígado das 64 tilápias com sintomatologia clínica, Uberlândia, 2018..... | 34 |
| Tabela 6. | Achados macroscópicos na necropsia e detecção de DNA de <i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>orientalis</i> em tilápias por meio de PCR..... | 37 |
| Tabela 7. | Relação entre os resultados obtidos diante dos diagnósticos realizados durante o estudo..... | 39 |
| Tabela 8. | Associação entre os resultados obtidos entre lesão cutânea e nódulo, nódulo e PCR e lesão cutânea e PCR utilizando o Teste exato de Fischer..... | 39 |
| Tabela 9. | Pesquisa de detecção de <i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>orientalis</i> em tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>) nos últimos anos..... | 44 |

RESUMO

Francisella noatunensis é um importante patógeno causador da Franciselose, responsável por altas mortalidades em tilápias do Nilo. Essa doença tem como principal característica a presença de granulomas em órgãos, principalmente no baço. O objetivo dessa pesquisa foi identificar a ocorrência e descrever alterações anatomopatológicas e histopatológicas em tilápias do Nilo, infectadas naturalmente com *Francisella noatunensis* subps. *orientalis* (Fno), na região da Bacia do Rio Araguari, Minas Gerais, Brasil. As tilápias foram provenientes de quatro produções em tanque-rede, com relatos de 40 a 60% de mortalidade em Julho, 2017, mês com baixa na temperatura ambiental e da água. As tilápias que apresentaram sinais clínicos inespecíficos foram coletadas, armazenadas em sacos plásticos contendo água do ambiente e encaminhadas no gelo para avaliações anatomopatológicas e histopatológicas em laboratório. Na necropsia foi observado a presença de nódulos brancacentos, com aspecto de granuloma, no baço 59/64 (92,2%), rim 24/64 (37,5%) e fígado 09/64 (14,1%). Não foram encontradas lesões em rim e/ou fígado sem haver lesão nodular branca no baço. No exame histopatológico, o baço foi o órgão mais acometido por lesões 59/64 (92,2%) sendo a esplenite granulomatosa grave 27/59 (45,8%) a mais frequente; no rim, nefrite granulomatosa 52/64 (81,3%) e; no fígado, o órgão que menos apresentou lesões teciduais, sendo esteatose 35/64 (54,7%), seguida de congestão 26/64 (40,6%) e hepatite granulomatosa 23/64 (36,0%). Posteriormente, fragmentos do baço de 50 entre as 64 tilápias coletadas, foram enviados para a identificação molecular, no qual foi detectado Fno em 98% (49/50) das amostras, pela PCR. Vale ressaltar que a tilápia com ausência de fno pela PCR, apresentou lesão cutânea e presença de nódulos brancacentos durante a necropsia. Foi observado que quando havia lesões granulomatosas no baço e no rim, simultaneamente, também havia úlceras na pele do mesmo animal, o que diferiu significativamente, sugerindo que a lesão cutânea está relacionada com a presença da Fno em tilápias, servindo de auxílio para o produtor

suspeitar da doença e agir com medidas a fim de se evitar maiores perdas. Dessa forma, pode-se concluir que o alto índice de Fno encontrado nesta pesquisa, caracteriza surtos na região, servindo de alerta para a piscicultura brasileira e principalmente para os produtores da região. Ressalta-se que há espécies zoonóticas pertencentes ao grupo da Francisella, porém, ainda não se sabe qual o potencial zoonótico da Fno, principalmente através do consumo de carne de tilápias.

Palavras-Chave: Franciselose, granuloma, histopatológico, lesão cutânea, *Oreochromis niloticus*, PCR.

ABSTRACT

Francisella noatunensis is a pathogen of importance, mainly as it is the cause of Franciselose, which is responsible for high death rates in Nile tilapia. This bacteria is characterized through the presence of granulomas in organs, mainly the spleen. The objective behind this study was to identify and describe anatomopathological and histopathological alterations in Nile tilapia, which have been naturally infected by *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (Fno), in the region of the Bacia do Rio Araguari, Minas Gerais, Brazil. The tilapias were collected from four commercial fish breeding nets, with reports of 40 to 60% mortality rates in July, 2017, a month that has a drop in the environmental temperature of the water. The tilapia that presented nonspecific clinical signs were collected, stored in plastic bags with water from their environment and sent in ice for anatomopathological and histopathological evaluations in the laboratory. In the necropsy, there was presence of white nodules, with a granulomatous appearance, in the spleen 59/64 (92.2%), kidney 24/64 (37.5%) and liver 09/64 (14.1%). Lesions were not found in the kidney and/or liver without there being white nodules on the spleen. In the histopathological exam, the spleen was the organ most damaged by lesions 59/64 (92.2%) with severe granulomatous splenitis 27/59 (45.8%) being the most frequent; in the kidney, granulomatous nephritis 52/64 (81.3%) and in the liver, the organ that showed least tissue lesions, with steatosis 35/64 (54.7%), followed by congestion 26/64 (40.6%) and granulomatous hepatitis 23/64 (36.0%). Posteriorly, fragments from the spleen of 50 from among the 64 collected tilapia were sent for molecular identification, in which Fno was detected in 98% (49/50) of the samples, by PCR. Only in the spleen of one of the tilapias there was no Fno detected, however, it is worth noting that this tilapia presented skin lesions and the presence of white nodules were noted during the necropsy. Noteworthy when there were granulomatous simultaneous lesions in the spleen and kidney, there were also observed ulcers on the skin of that animal specimen. This differed significantly, suggesting that the skin lesion is related to the presence of

Fno in tilapias, serving as an aid for the producer to suspect the presence of the disease and perform a rapid diagnosis, in order to avoid greater losses. From the aforementioned, one can conclude that the high rate of Fno found in this study characterizes outbreaks in the region, which serves as a warning to the Brazilian fish farming industry and principally those fish producers from the region. Highlighted here is that there are zoonotic species that belong to the group of *Francisella* spp., for which their potential Fno is still not known, principally in terms of the consumption of tilapia meat.

Key Words: Franciselose, granuloma, histopathologic, *Oreochromis niloticus*, PCR, skin lesion.

1. INTRODUÇÃO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) é uma espécie tropical, originária da Bacia do rio Nilo, na África (TREWAVAS, 1983). A temperatura para seu crescimento varia entre 20 e 35°C sendo que o seu desenvolvimento é prejudicado em temperaturas abaixo de 16°C, em que para de se alimentar (BALARIN, HALLER, 1982; CHERVINSKI, 1982; FAO, 2005). É uma espécie de rápido crescimento, tolerante a uma grande amplitude de condições ambientais, rústica, com habilidade de se reproduzir em cativeiro e alimentação onívora, com fácil aceitação de dietas artificiais (EL-SAYED, 2006).

A intensificação da piscicultura e o crescimento da tilapicultura no Brasil criou um ambiente favorável para a ocorrência de surtos epizooticos de doenças infecciosas, devido à alta densidade de estocagem, aumento do estresse, maior amplitude dos parâmetros ambientais e erros diversos de manejo (TAVARES-DIAS, 2009; RAGHIANTE et al., 2017). Além desses fatores, sabe-se que as tilápias são susceptíveis à infecção por diversas bactérias (KLUGE, 1965; SOTO et al., 2010; BAUMGARTNER, HAWKE, 2011; COSTA et al., 2014), entre elas a *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (Fno), um patógeno Gram negativo intracelular facultativo, associada a surtos da doença conhecida como franciselose (ASSIS et al., 2016).

A fno na maior parte das vezes afeta peixes mais jovens, como alevinos e juvenis, normalmente quando há queda na temperatura da água abaixo de 24°C (SOTO et al., 2012a; LEAL et al., 2014; QIANG et al., 2015; ORTEGA et al., 2016). Esse é um fator preocupante na sanidade aquícola para garantir a sobrevivência dos juvenis nas fazendas de recria.

As principais características da franciselose em peixes são altas morbidade e mortalidade, associado à presença de granulomas em múltiplos órgãos, principalmente no baço (BIRKBECK et al., 2011; COLQUHOUN, DUODU, 2011). O diagnóstico de infecções por Fno é uma questão desafiadora por ser uma bactéria intracelular exigente e que, por via

convencional, como o isolamento bacteriano, se restringe quanto às condições e tempo para o crescimento dessa bactéria fastidiosa (SOTO et al., 2010; DUODU et al., 2012; ASSIS et al., 2016).

Os órgãos de eleição para estudos histopatológicos em peixes normalmente são as brânquias, fígado, pâncreas, baço, coração, rim, tegumento, olhos, intestino e bexiga natatória (SARAIVA, 2006). O fígado nos peixes é o órgão metabolizador por excelência de todas as substâncias que o atingem através do sangue, além de desempenhar funções pancreáticas, assim, esse órgão também serve como referência histopatológica para a análise do dano tecidual causado por algum agente etiológico ou poluente ambiental (AMARAL et al., 2002).

A avaliação macroscópica das lesões e coleta de amostras para análise microscópica são recursos para avaliar o estado geral dos peixes que foram a óbito ou eutanasiados para esta finalidade. Diante das características macro e microscópicas das lesões é possível diagnosticar enfermidades e a partir da adoção de medidas terapêuticas e preventivas adequadas evita-se mortalidade na produção de peixes.

A utilização de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de Fno em peixes parte do princípio da capacidade de amplificar uma sequência de DNA de forma rápida e precisa, com elevada sensibilidade e especificidade (JORDE, CAREY, BAMSHAD, 2010; RAGHIANTE et al., 2017). Essa técnica foi utilizada por outros pesquisadores para a isolamento da Fno em bacalhau do Atlântico (Cod) (KULKARNI et al., 2011), salmão (BIRKBECK et al., 2007) e tilápia (HSIEH et al., 2006; NGUYEN et al., 2016; ORTEGA et al., 2016; RAMIREZ-PAREDES et al., 2017).

Sabendo da importância do rápido diagnóstico, esta pesquisa teve como objetivo identificar a ocorrência e descrever as principais alterações anatomopatológicas e histopatológicas, e detectar a presença de Fno em juvenis de tilápias do Nilo cultivadas em tanques-rede, provenientes de pisciculturas com relatos de alta mortalidade em um mês de baixa temperatura ambiente, na Bacia do Rio Araguari, Minas Gerais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção e Consumo de Tilápias

Publicações no Anuário da Associação Brasileira de Piscicultura – Peixe BR (2018), afirmam que o pescado é a proteína de origem animal mais produzida no mundo, já que, de acordo com estudo da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) e a FAO (Organização da Alimentação e Agricultura da ONU), em 2017 foram produzidos 172 milhões de toneladas de Pescado (peixes de cultivo e peixes de captura), bem acima da carne suína (2ª colocada), responsável por 120 milhões de toneladas.

A produção aquícola brasileira teve seus primeiros registros na FAO em 1969, com menos de 10 toneladas produzidas ao ano. Até o início da década de 1990 foi observado crescimento da atividade, que apesar de pequeno, foi constante e regular. O surgimento dos pesque-pague auxiliou a impulsionar o setor, fazendo com que a tilápia se destacasse, acarretando no início da produção profissional de tilápias. Além disso, com a possibilidade de intensificar a produção através do uso de tanques-rede em águas públicas, a produção de tilápia cresceu 386% no período de 2005 a 2015 (EMBRAPA, 2018).

A tilapicultura é a produção entre os pescados que mais cresce no mundo e é a primeira no Brasil com crescimento de cerca de 15% ao ano (OLIVEIRA et al., 2007; VICENTE, ELIAS, FONSECA-ALVES, 2014). No ano de 2017, a produção brasileira de Tilápia foi de 357.639 toneladas, representando 51% do volume total entre as principais espécies produzidas no país. Dessa forma, o Brasil tornou-se o 4º maior produtor de tilápias, atrás apenas da China, Indonésia e Egito, de acordo com levantamento da Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR, 2018).

A maior concentração da produção de tilápia no Brasil ocorre na região Sul (42%), seguido pelas regiões Sudeste (26%), Nordeste (24%) e Centro-

Oeste (8%) (IBGE, 2015; EMBRAPA, 2018) (Figura 1). Apesar da concentração da produção nas regiões Sul e Sudeste, são as regiões quentes as mais favoráveis ao crescimento da tilápia enquanto que, nas regiões com períodos mais frios há uma redução do crescimento dos peixes (EMBRAPA, 2018).

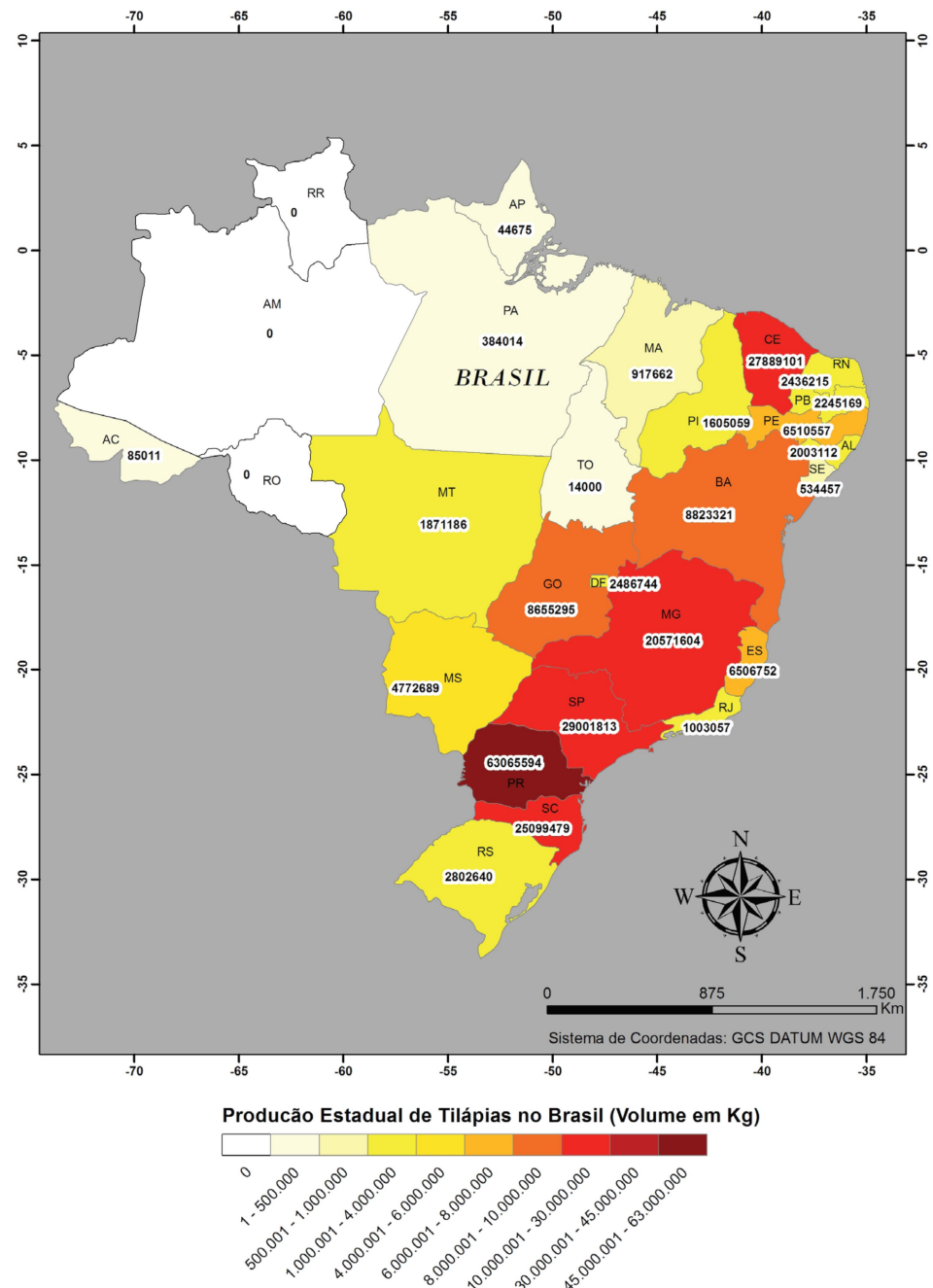


Figura 1: Produção anual de tilápias no Brasil, por estado.

Fonte: Elaborado por Daniel Chaves Webber com dados do IBGE (2017). Dados de Produção: IBGE (2015). (EMBRAPA, 2018)

A indústria brasileira de tilápia atende, principalmente, o mercado interno, sendo que 99% da produção nacional é consumida no Brasil. As estatísticas são controversas, mas há consenso de que o consumo de peixes no Brasil não ultrapassa 9,5 kg/hab/ano e segundo a FAO/ONU, esse patamar equivale à média mundial da década de 60, sendo que, atualmente, a recomendação é para demanda per capita de 20kg/hab/ano (PEIXE BR, 2018). Em um estudo com intuito de diagnóstico da cadeia da tilapicultura realizada pela Embrapa (2018), estimou-se que com uma população aproximada em 205 milhões de pessoas em 2015, cada brasileiro consome 1,1 kg tilápia por ano.

2.2. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758)

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) é uma espécie tropical, originária da Bacia do rio Nilo, na África (TREWAVAS, 1983) e é a principal espécie cultivada dentro da tilapicultura. É considerada uma espécie rústica, cuja temperatura ideal para seu crescimento varia entre 2°C e 30°C, entretanto, seu desenvolvimento é prejudicado em temperaturas abaixo de 15°C (SOTO et al., 2014).

A tilápia do Nilo destaca-se por sua resistência a determinadas doenças, tolerância ao cultivo em altas densidades e em ambientes hostis e estressantes, desovas durante todo o ano, além de apresentarem alta atratividade pelo consumidor (TEIXEIRA, 2006).

Estudos comprovaram que a carne é saborosa, possui elevado valor nutricional com baixo teor de gordura (0,9%) e de calorias (172 Kcal/100g de carne), textura e paladar aceitável, além de apresentar um rendimento de filé em torno de 30 a 40%, obtendo assim aprovação tanto pelo consumidor quanto para a indústria (NOGUEIRA, RODRIGUES, 2007; GONÇALVES, 2015; MESQUITA et al., 2016).

O sistema de produção de tilápias no Brasil divide-se em criações em tanques de terra (viveiros) e em tanques-rede. Os viveiros escavados demandam maiores investimentos na implantação, entretanto, possuem menor incidência de determinadas doenças (KUBITZA, 2008). Já a criação intensiva de tilápias em tanques-rede utiliza o meio ambiente de forma sustentável, possibilitando a livre e constante circulação de água e, por isso, a possibilidade de introdução de patógenos (TEIXEIRA, 2006; MORI, 2012).

A tilápia vem sendo alvo de muitos estudos quanto as possíveis doenças que podem apresentar quando infestadas por parasitas (VALLADÃO et al., 2014) e fungos (EL-SHAROUNY, BADRAN, 1995, OKAEME, OLUFEMI, 1997) e infectadas por bactérias (KLUGE, 1965; BAUMGARTHER, HAWKE, 2011; MOURÃO, 2013; COSTA et al., 2014; ASSIS et al., 2016; RAGHIANTE, 2016; RODRIGUES et al., 2018) e vírus (EL-SAYED, 2006).

2.3. *Francisella* spp. (Franciselose)

Francisella spp. são bactérias pertencentes à família Francisellaceae, com características de serem cocobastonetes gram-negativos imóveis, álcool-ácido-resistentes, oxidase negativa, catalase positivo fraco, parasitas intracelulares, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. São micro-organismos fastidiosos que requerem a adição de cisteína ao ágar sangue para crescimento em laboratório (SOTO et al., 2012; MARTINS et al., 2015).

Dentre as espécies reconhecidas estão: *F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. hispaniensis*, *F. haliotida*, *F. pérsica* e *F. noatunensis*, sendo que esta última divide-se em duas subespécies: *Francisella noatunensis noatunensis* e *Francisella noatunensis orientalis* (OTTEM et al., 2009; HUBER et al., 2010; BREVIK et al., 2011; GONÇALVES, 2015).

Fno é extremamente virulenta para diversas espécies de peixes marinhos e de água doce, causando também, doença em mamíferos, incluindo

humanos, no caso da tularemia pela infecção por *F. tularensis* (KUBITZA, 2008). Há relatos da bactéria *F. philomiragia*, anteriormente conhecida como *Yersinia philomiragia*, isolada de casos de doença humana (WENGER et al., 1989).

A doença em peixes causada pela presença da bactéria *Francisella noatunensis orientalis*, conhecida como franciselose, é capaz de causar diversos danos, principalmente em tilápias (SOTO et al., 2009; LEAL et al., 2014). Não há relatos de doenças por *F. noatunensis* em seres humanos e, ainda não se sabe o potencial zoonótico desta espécie, proveniente pelo consumo de carne de tilápias. Entretanto, em um estudo feito em bacalhau (Cod) (*Gadus morhua*), por Nylund et al. (2006), foi detectada uma nova espécie do gênero *Francisella*, na qual, através de uma análise de similaridade genética utilizando sequências conhecidas de DNA da *Francisella* spp., o isolado apresentou 97,7% de semelhança à *F. tularensis*, 99,1% à *F. philomiragia* e 96,8% de *Francisella* isolada de tilápia.

A queda na temperatura ambiental e da água é um fator que se repete em vários estudos, relacionado à capacidade de bactérias do gênero *Francisella* infectar tilápias (NYLUND et al., 2006; LEAL et al., 2014; SEBASTIÃO et al., 2017).

Sinais clínicos não específicos como apatia, letargia, isolamento do cardume, palidez de pele ou brânquias, lesões e manchas pelo corpo, perda de apetite, necrose, hemorragia em nadadeiras, além de mortalidade elevada, caracterizam doenças de etiologia bacteriana nos peixes, incluindo a franciselose (SILVA, 2010; MOURÃO, 2013; ASSIS et al., 2016). Durante a necropsia, é possível observar a presença de um grande número de nódulos brancacentos no baço, fígado e rim, e ocasionalmente no fígado e coração e hemorragia em vísceras (JEFFERY et al., 2010; COLQUHOUN; DUODU, 2011).

2.3.1. Diagnóstico e Controle de *Francisella* spp.

Vários estudos mostraram que *Francisella* spp. estão presentes em carrapatos, amebas, peixes e amostras ambientais (SUITOR, WEISS, 1961; NIEBYLSKI et al., 1997; NODA et al., 1997; ANDA et al., 2001; SCOLES, 2004; KAMAISHI et al., 2005; BARNES et al., 2005).

Os primeiros relatos da Franciselose em tilápias no mundo aconteceram em Taiwan em 1992 (CHEN et al., 1994; CHERN; CHAO, 1994) e no Brasil com descrição em 2014 provenientes de surtos desde 2012 (LEAL et al., 2014).

A suspeita da presença da bactéria em peixes inicia-se com a observação dos sinais clínicos característicos da doença e, posteriormente, pelas alterações macroscópicas observadas durante a necropsia, como a presença de nódulos brancacentos em órgãos. A coleta de fragmentos de órgãos para a visualização microscópica auxilia na avaliação do estado geral dos peixes com suspeita de Franciselose. O isolamento por cultivo bacteriano é uma opção, porém, se restringe quanto às condições e tempo para o crescimento desta bactéria fastidiosa (SOTO et al., 2010).

A detecção precoce e precisa de Fno é crucial para definir medidas apropriadas de controle de surtos em fazendas de tilápia e por isso, as técnicas moleculares, como a PCR e as demais técnicas que utilizam o DNA para diagnóstico, vem sendo utilizadas para a detecção de forma rápida, com elevada sensibilidade e especificidade à bactéria (JORDE, CAREY, BAMSHAD, 2010; RAGHIANTE, 2016; RAGHIANTE et al., 2017).

Para a prevenção de algumas doenças em peixes usa-se a aplicação de vacinas. Em 2017, alguns pesquisadores descobriram que a deleção de um gene em *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* gera uma cepa imunogênica que, após injeção intraperitoneal em o peixe-zebra adulto induziu imunidade protetora contra um dose letal da estirpe, é um estudo modelo e como os autores sugerem, devem ser testados em hospedeiro natural, além do peixe-zebra (LAMPE et al., 2017). Desde então, ainda não há relatos de vacinas contra a franciselose para tilápias.

No entanto, sabe-se, que o florfenicol pode ser utilizado para tratamentos, quando administrado durante os estágios iniciais da infecção

(SOTO et al., 2010) e que a oxitetraciclina (CHERN; CHAO, 1994) e a tetraciclina (MAUEL et al., 2005; OSTLAND et al., 2006) demonstraram certo grau de eficácia para o tratamento da franciselose.

Infelizmente muitos produtores rurais responsáveis pela criação de tilápias fazem o tratamento com antimicrobianos, sem o diagnóstico preciso, o que pode induzir a morte de bactérias inofensivas e ainda induzir resistência bacteriana em cepas virulentas. O uso racional de antimicrobianos é preocupação mundial (OIE, 2018) e por isso faz-se necessário conhecer as principais alterações anatomopatológicas e histopatológicas, e verificar o envolvimento de Fno em tilápias do Nilo cultivadas em tanques-rede na região da Bacia do Rio Araguari, Minas Gerais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de Amostras

O presente trabalho obteve aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo nº 079/17 (Anexo 1).

Para este estudo foram realizadas quatro coletas a partir de quatro pisciculturas com índice crônico de mortalidade. As pisciculturas estão localizadas na bacia hidrográfica do Rio Araguari, Minas Gerais, Brasil (Figura 2).

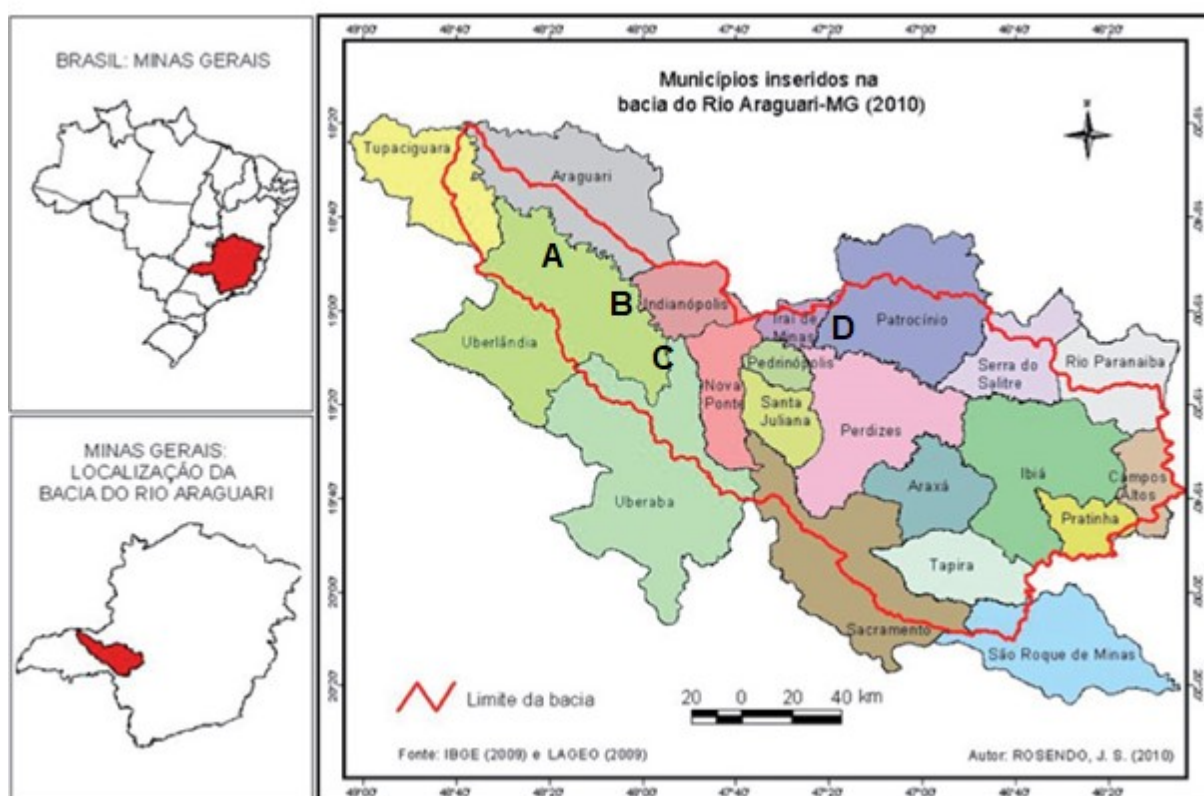


Figura 2: Localização aproximada das pisciculturas A, B, C e D pertencentes a Bacia do Rio Araguari, localizado no estado de Minas Gerais, Brasil.

Fonte: Rosendo, Rosa (2012)

As coletas foram feitas no mês de Julho de 2017, período em que a temperatura ambiente média mínima foi de 14,5°C e máxima de 24°C (INMET, 2017). Utilizando um passaguá foi coletado um total de 64 tilápias do Nilo (Tabela 1), todos juvenis, pesando entre 80 e 250 gramas, criadas em tanque-rede.

Tabela 1: Número de tilápias coletadas para anatomopatológico, histopatológico e para identificação molecular por PCR, por piscicultura.

| Pisciculturas | Técnicas de Diagnóstico | |
|---------------|-------------------------------------|-----|
| | Anatomopatológico e Histopatológico | PCR |
| A | 13 | 12 |
| B | 5 | 4 |
| C | 24 | 19 |
| D | 22 | 15 |
| TOTAL | 64 | 50 |

Os tanques-rede (Figura 3) apresentavam duas dimensões diferentes, sendo que os de 3x3x3 metros (largura x comprimento x altura) continham aproximadamente 10 mil tilápias e os de 4x4x3 metros aproximadamente 20 mil tilápias.



Figura 3: Piscicultura A, ilustrando os tanques-rede onde as tilápias são produzidas.

Fonte: Acervo da autora.

As tilápias coletadas apresentavam pelo menos algum sinal clínico, observados dentro do tanque, como, hiporexia, apatia, letargia, isolamento do cardume, natação errática, palidez de pele ou brânquias, úlceras próximas às nadadeiras, e manchas pelo corpo. Nenhuma das tilápias avaliadas estava sendo medicado durante a coleta.

Grupos de cinco tilápias foram colocados em sacolas plásticas, contendo água do próprio local, devidamente lacradas e identificadas. As tilápias vivas foram armazenadas em isopor contendo gelo e encaminhadas para o Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC – UFU).

Os animais foram eutanasiados de acordo com Diretrizes da Prática de Eutanásia do Comitê de Experimentação Animal (CONCEA), imersos em sobredosagem (três vezes a dose anestésica) de benzocaína (262,5mg/L) em 10L de água por aproximadamente dez minutos, até o cessar do movimento opercular e óbito (BITTENCOURT et al., 2012). Em seguida foram necropsiados, com incisão e abertura da cavidade visceral e exposição dos órgãos, sendo os achados macroscópicos registrados em planilhas quando dignos de nota.

3.2. Histopatológico

Fragmentos de baço, rim e fígado das tilápias foram coletados para exame histopatológico e fixados em formalina 10% tamponada. Após fixação, as amostras foram processadas rotineiramente para confecção de lâminas histológicas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) (GENTEN, TERWINGHE, DANGUY, 2009) no Laboratório de Histopatologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio Colemann® DN 107T.

As lesões foram classificadas qualitativamente (degenerativas, inflamatórias, necróticas) e quantitativamente em cinco classes, de acordo com o número de células com modificações morfológicas, sendo, leve até 20%, leve a moderada de 20 a 40%, moderada de 40 a 60%, moderada a acentuada de 60 a 80% e acentuada acima de 80%.

Das 64 tilápias necropsiadas, 50 dos quais apresentaram maiores lesões visualmente, foram coletados fragmentos de baço, imersos em álcool absoluto, identificados de acordo com a piscicultura de origem (A1 a A13; B1 a B5; C1 a C24; D1 a D25) e enviados para o Laboratório de Diagnóstico e Sanidade Aquícola PREVET, em Jaboticabal, SP, para identificação molecular por PCR.

3.3. Diagnóstico Molecular

Para a extração de DNA dos 50 fragmentos de baço das tilápias analisadas, foi utilizado o Kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen®) e o protocolo seguido de acordo com o fabricante com adaptações seguindo o protocolo utilizado no laboratório, da seguinte forma: Cada fragmento de baço foi pulverizado utilizando pilão em almofariz com nitrogênio líquido, pesadas alíquotas de 10mg de cada amostra que foram colocadas em tubos de microcentrífuga, Foi adicionado 180µl de tampão ATL e 20µl de proteinase K, incubado a 56°C por 3 horas até a lise completa do tecido. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, adicionadas 200 µl de tampão AL, homogeneizadas por 15 segundos em vortex e incubadas a 70°C por 10 minutos. Foi adicionado 200µl de etanol (96–100%) às amostras e homogeneizadas por 15 segundos. A mistura formada de cada amostra foi centrifugada a 8000rpm durante 1 minuto, posteriormente foi adicionado 500µl de Buffer AW1, centrifugado novamente a 8000rpm por 1 minuto, adicionado 500µl de Buffer AW2, e centrifugado a 14000rpm por 3 minutos. Após centrifugação, foi adicionado 100µl de água destilada e incubado a temperatura ambiente por 1 minuto e, em seguida, centrifugado a 8000rpm por 1 minuto.

Desta forma, as amostras foram preparadas para a execução da PCR. O par de primers específico para reconhecimento da região ribossomal 16S e o tamanho esperado do produto amplificado estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers* usados na reação de PCR para detecção de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em baço de tilápias.

| Tamanho do produto amplificado (bp) ¹ | Sequência (5'3') | Referência |
|--|--|-------------------|
| 286 | F: GCGGATTAAAGGTGGCCTTTGC R: CCTGCAAGCTATTAACCTCACAGG | Soto et al., 2010 |

¹bp: pares de base.

Para a realização da PCR, utilizou-se uma mistura de reagentes contendo os seguintes elementos: 50ng de DNA da amostra, 1x PCR buffer, 2mM MgCl₂, concentrações de 25µM dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 10mM primer e 0,3U de HotMaster Taq DNA polymerase para um volume total de 20µl. As amostras foram amplificadas seguindo um passo de desnaturação durante 3 minutos a 95°C, seguido de 36 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 58°C durante 40 segundos e 72°C durante 1 minuto e finalmente um ciclo de 72° C durante 5 minutos. Em seguida, 5µl dos produtos de PCR obtidos foram aplicados em gel de agarose a 1,5% fundido em tampão TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA; pH 8,0), e submetidos à eletroforese seguindo as recomendações de Sambrook e Russell (2001). A PCR foi realizada em triplicata para confiabilidade dos resultados.

3.4. Análise Estatística

Após a obtenção dos resultados de necropsia, histopatológico e identificação molecular por PCR, foi aplicado o Teste exato de Fisher, para a verificação de possível associação entre os dados, pelo programa Bioestat 5.0.

4. RESULTADOS

A mortalidade das tilápias do Nilo analisadas variou entre 40 e 60%, de acordo com relatos dos produtores. Além disso, durante a captura, foi possível observar sinais clínicos como apatia, letargia, isolamento do cardume, palidez de pele ou brânquias, úlceras próximos às nadadeiras, e manchas brancacentas pelo corpo.

Durante a necropsia das tilápias, como achados macroscópicos, foram observados múltiplos nódulos brancacentos, delimitados e distribuídos, com aspectos de granuloma pelo baço, rim e fígado. O órgão mais acometido foi o baço (Figura 4) em 92,2% das amostras (59/64), seguido pelo rim (37,5% - 24/64) e fígado (14,1% - 9/64).

Todas as tilápias que apresentaram lesões em rim e/ou fígado também apresentavam nódulos no baço. Foi observado que quando havia lesões no baço e no rim, simultaneamente, também havia manchas e úlceras externamente, na pele, principalmente, próximas às nadadeiras.

4.1. Histopatológico

No estudo histopatológico das 64 tilápias, foram encontradas lesões granulomatosas em baço 59/64 (92,2%), rim 52/64 (81,3%) e fígado 23/64 (36,0%), sugestivas de processo infeccioso devido à presença de granuloma.

Como achado mais relevante no exame histopatológico do baço, encontrou-se esplenite granulomatosa acentuada 27/59 (45,8%) (Figura 4, Tabela 3).

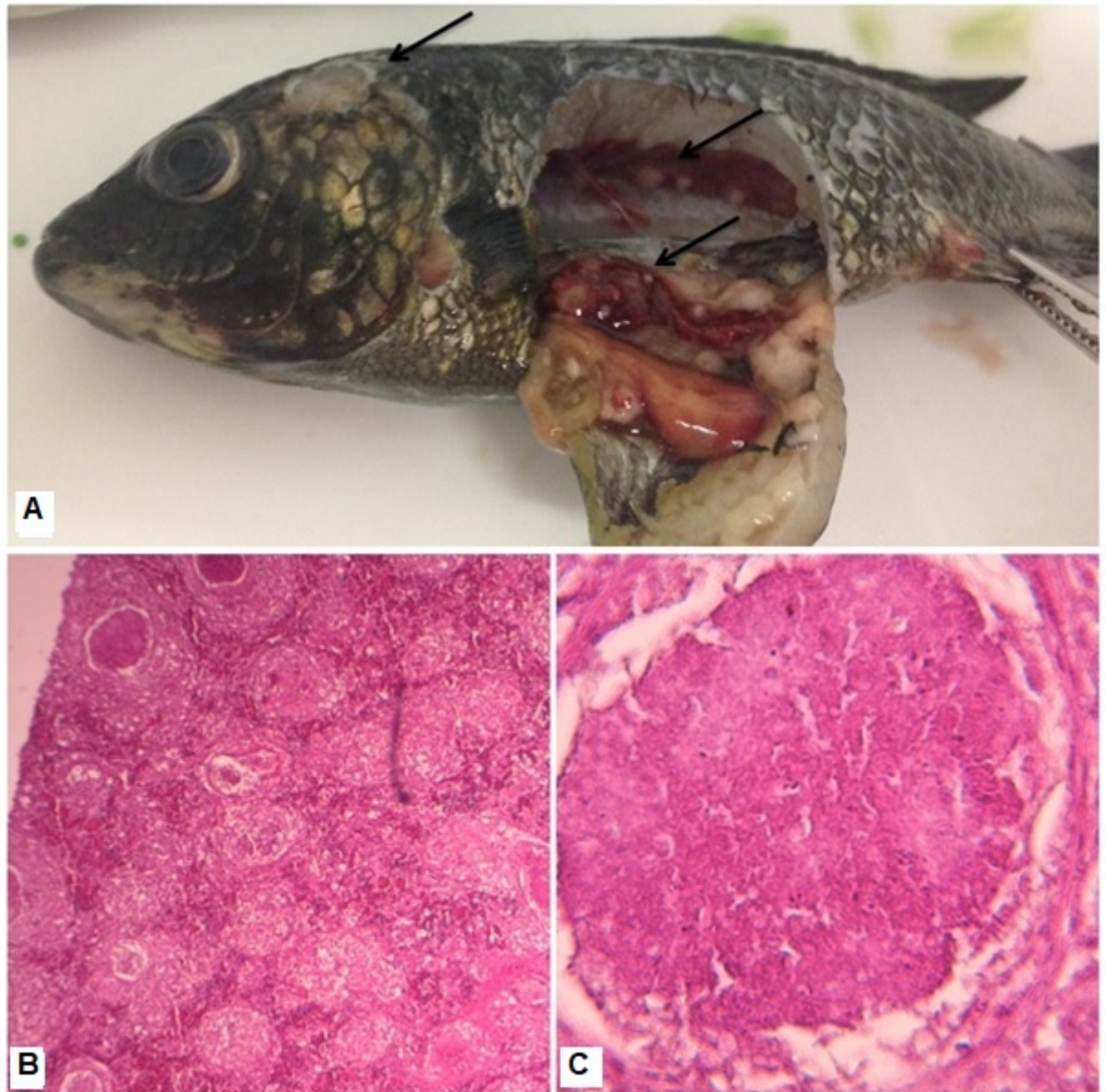


Figura 4. A: Vista lateral de tilápia com úlcera na pele e nódulos brancacentos no baço e rim (seta preta). B: Fotomicrografia de baço de tilápia, com múltiplos focos granulomatosos, caracterizando esplenite granulomatosa acentuada, (4x). Hematoxilina e eosina (HE). C: Fotomicrografia de baço de tilápia, Granuloma, (40x). (HE).

Tabela 3. Alterações histopatológicas no baço de 64 tilápias com sintomatologia clínica, Uberlândia, 2018.

| Alterações histopatológicas | Nº | % |
|-----------------------------|----|-------|
| Esplenite Granulomatosa | 59 | 92,2 |
| Leve | 09 | 1,7 |
| Leve a Moderado | 05 | 8,5 |
| Moderado | 09 | 15,2 |
| Moderado a Acentuado | 09 | 15,2 |
| Acentuado | 27 | 45,8 |
| Nada digno de nota | 05 | 8,5 |
| TOTAL | 64 | 100,0 |

O exame histopatológico de rim revelou que todas as tilápias avaliadas 64/64 (100%) tiveram alterações teciduais. Sendo que 52/64 (81,3%) apresentaram nefrite granulomatosa, 49/64 (76,6%) hemorragia, 29/64 (45,3%) degeneração hialina, 19/64 (29,7%) necrose tubular e 9/64 (14,0%) edema peritubular (Figura 5, Tabela 4). Observou-se que, num mesmo animal, quando havia lesão no rim, também havia lesão no baço, e, nestes dois órgãos, foi possível observar a presença de melanomacrófagos. Vale ressaltar que mais de uma alteração histopatológica foi observada no rim de cada tilápia avaliada.

Tabela 4. Alterações histopatológicas em rim de 64 tilápias com sintomatologia clínica, Uberlândia, 2018.

| Alteração Histopatológica | Nº | % |
|---------------------------|----|------|
| Degeneração hialina | 29 | 45,3 |
| Edema Peritubular | 09 | 14,0 |
| Hemorragia | 49 | 76,6 |
| Necrose Tubular | 19 | 29,7 |
| Nefrite Granulomatosa | 52 | 81,3 |
| Leve | 30 | 57,6 |
| Moderado | 16 | 30,8 |
| Acentuado | 06 | 11,5 |

O exame histopatológico de amostras do fígado revelou 35/64 (54,7%) amostras com degeneração macrovesicular, 26/64 (40,6%) congestão, 23/64 (36,0%) hepatite granulomatosa, 15/64 (23,4%) degeneração microvesicular, 10/64 (15,6%) inflamação, 7/64 (11,0%) necrose (Tabela 5, Figura 5). Além disso, como o tecido pancreático é difuso no fígado de peixes (intra-hepático) (BANKS, 1992), foi possível observar pancreatite granulomatosa 16/64 (25%). Vale ressaltar que mais de uma alteração histopatológica foi observada no fígado de cada tilápia avaliada.

Tabela 5. Alterações histopatológicas no fígado das 64 tilápias com sintomatologia clínica, Uberlândia, 2018.

| Alteração Histopatológica | Nº | % |
|----------------------------|----|------|
| Congestão | 26 | 40,6 |
| Degeneração microvesicular | 15 | 23,4 |
| Degeneração macrovesicular | 35 | 54,7 |
| Inflamação | 10 | 15,6 |
| Necrose | 07 | 11,0 |
| Pancreatite granulomatosa | 16 | 25,0 |
| Hepatite granulomatosa | 23 | 36,0 |
| Leve | 21 | 91,3 |
| Moderado | 02 | 8,7 |

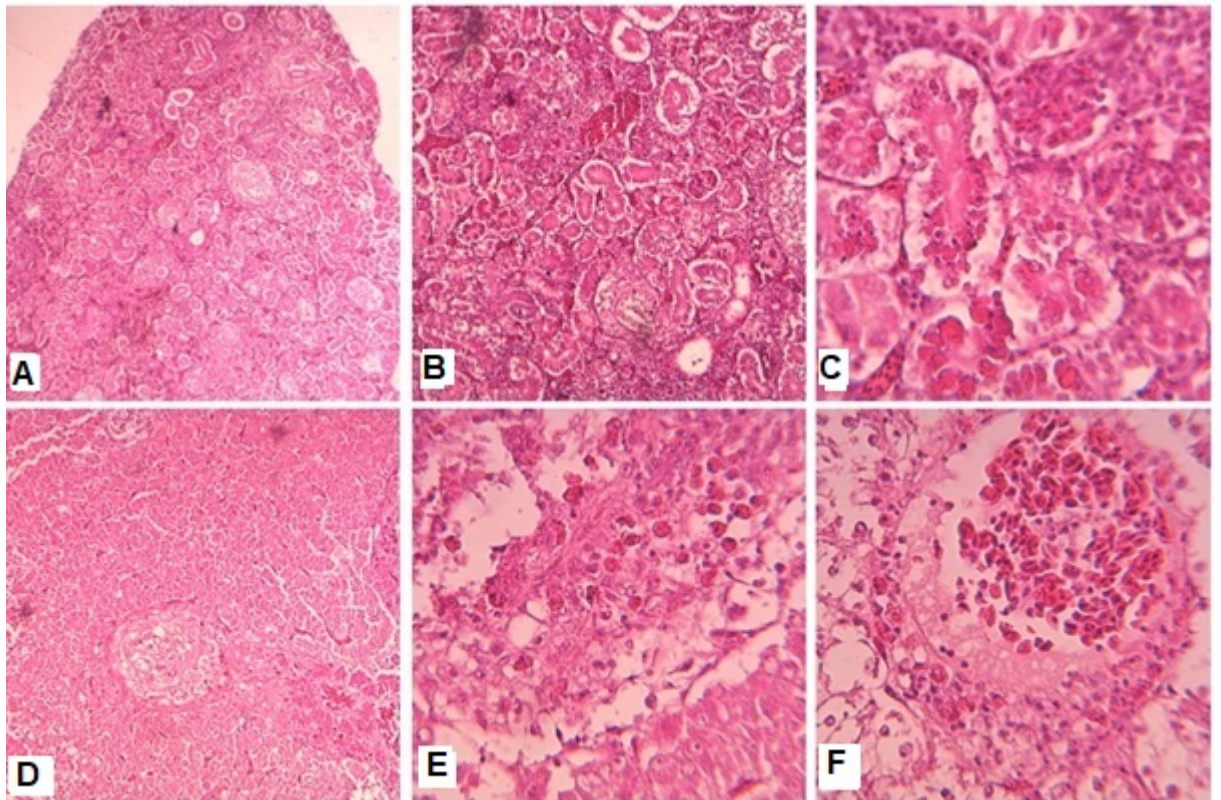


Figura 5. A: Fotomicrografia de rim de tilápia com focos de granuloma, caracterizando nefrite granulomatosa moderada, (4x). (HE). B: Fotomicrografia de rim de tilápia com edema peritubular, hemorragia e degeneração hialina (10x). (HE). C: Fotomicrografia de rim de tilápia com edema peritubular, hemorragia e degeneração hialina (40x). (HE). D: Fotomicrografia de fígado de tilápia com granuloma (10x). (HE). E: Fotomicrografia de fígado de tilápia com vasos congestos, edema e processo inflamatório leve (40x). (HE). F: Degeneração microvesicular em fígado de tilápia (40x). (HE).

4.2. Diagnóstico Molecular por PCR

Em 98% (49/50) dos fragmentos de baço das tilápias analisadas detectou-se Fno no diagnóstico de PCR. Apenas no baço da tilápia A8 não foi detectado Fno, entretanto, vale ressaltar que esta tilápia apresentou lesão cutânea e presença de nódulos brancacentos durante a necropsia.

Amostras positivas na reação de PCR com primers específicos para *Fno* geraram produtos de PCR que parearam ao redor de 286pb após corrida de eletroforese, com ausência apenas na tilápia A8 (Figura 6 e 7).

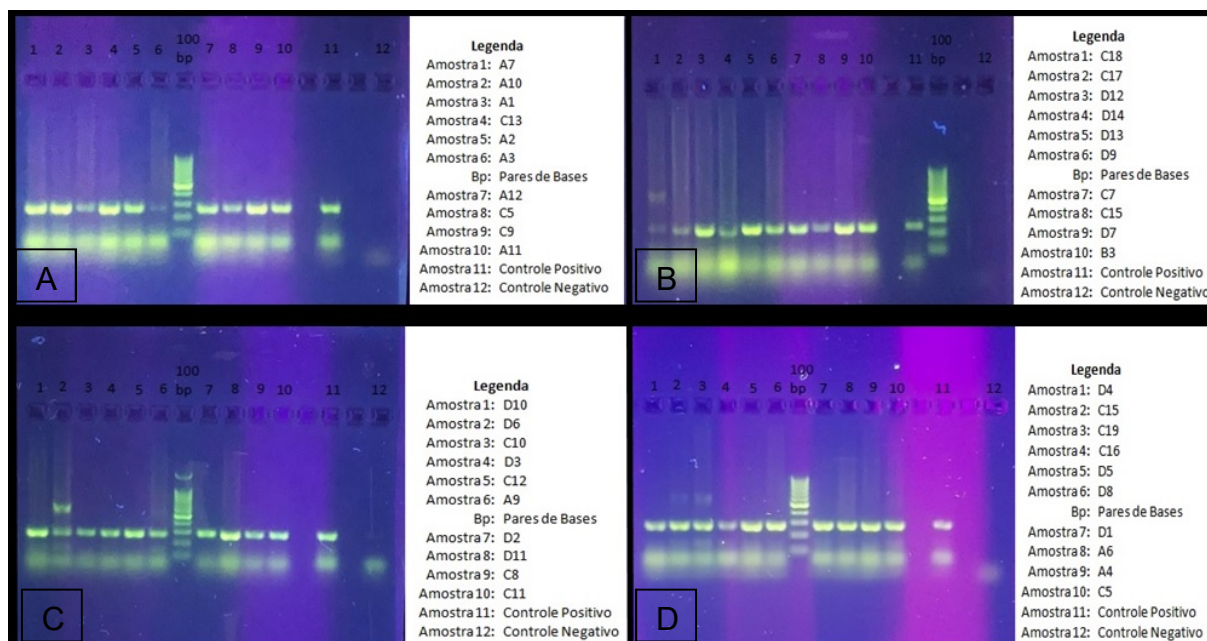


Figura 6. Resultados de detecção de *Fno* por PCR em tilápias. A: Gel de eletroforese de PCR demonstrando a presença de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em todos os fragmentos de baço analisados entre as tilápias A7, A10, A1, C13, A2, A3, A12, C5, C9, A11, Amostra 11: Controle positivo; Amostra 12: Controle negativo, Bp: pares de bases. B: Gel de eletroforese de PCR demonstrando a presença de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em todos os fragmentos de baço analisados entre as tilápias C18, C17, D12, D14, D13, D9, C7, C15, D7, B3; Amostra 11: Controle positivo; Amostra 12: Controle negativo, Bp: pares de bases. C: Gel de PCR demonstrando a presença de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em todos os fragmentos de baço analisados entre as tilápias D10, D6, C10, D3, C12, A9, D2, D11, C8, C11; Amostra 11: Controle positivo; Amostra 12: Controle negativo; Bp: pares de bases. D: Gel de PCR demonstrando a presença de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em todos os fragmentos de baço analisados entre as tilápias D4, C15, C19, C16, D5, D8, D1, A6, A4, C5; Amostra 11: Controle positivo; Amostra 12: Controle negativo; Bp: pares de bases.

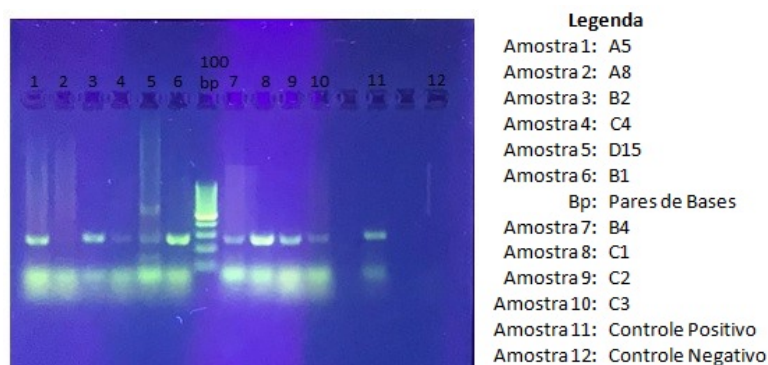


Figura 7: Gel de PCR demonstrando a presença de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em todos os fragmentos de baço analisados entre as tilápias A5, B2, C4, D15, B1, B4, C1, C2, C3; Tilápia A8: negativo; Amostra 11: Controle positivo; Amostra 12: Controle negativo; Bp: pares de bases.

Dentre os principais achados macroscópicos observados durante a necropsia, das tilápias avaliadas, destaca-se a presença de nódulos brancacentos que caracterizam o granuloma, peculiar na franciselose e lesões cutâneas. Estes dados foram relacionados com os resultados obtidos no PCR e descritos na Tabela 6 e 7.

Tabela 6: Achados macroscópicos na necropsia e detecção de DNA de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* por meio de PCR.

| Piscicultura | Tilápias | Nódulos brancacentos no baço | Lesões na pele | PCR |
|--------------|----------|------------------------------------|-------------------|-----|
| A | A1 | + | - | + |
| | A2 | + | - | + |
| | A3 | + | - | + |
| | A4 | + | - | + |
| | A5 | + | - | + |
| | A6 | + | + | + |
| | A7 | + | + | + |
| | A8 | + | + | - |
| | A9 | + | - | + |
| | A10 | + | - | + |
| | A11 | + | + | + |
| | A12 | + | - | + |

| | | | | |
|---|-----|---|---|---|
| B | B1 | + | - | + |
| | B2 | + | - | + |
| | B3 | + | - | + |
| | B4 | + | - | + |
| C | C1 | + | + | + |
| | C2 | + | + | + |
| | C3 | + | + | + |
| | C4 | + | - | + |
| | C5 | + | + | + |
| | C6 | + | - | + |
| | C7 | + | + | + |
| | C8 | + | - | + |
| | C9 | + | - | + |
| | C10 | + | + | + |
| | C11 | + | + | + |
| | C12 | + | + | + |
| | C13 | + | + | + |
| | C14 | + | + | + |
| | C15 | - | - | + |
| | C16 | - | - | + |
| | C17 | + | - | + |
| | C18 | + | - | + |
| | C19 | - | - | + |
| D | D1 | + | + | + |
| | D2 | + | + | + |
| | D3 | + | + | + |
| | D4 | + | + | + |
| | D5 | + | + | + |
| | D6 | - | - | + |
| | D7 | + | + | + |
| | D8 | + | + | + |
| | D9 | + | + | + |
| | D10 | + | + | + |
| | D11 | + | + | + |
| | D12 | + | + | + |
| | D13 | + | + | + |
| | D14 | + | + | + |
| | D15 | - | - | + |

Tabela 7: Relação entre os resultados obtidos diante dos diagnósticos realizados durante o estudo.

| Pisciculturas | Nº de tilápias coletadas | Lesões Cutâneas | Nódulos brancacentos sugestivos de granuloma no baço | PCR | |
|---------------|--------------------------|-----------------|--|------------|-----------|
| | | | | Nº | Positivos |
| A | 13 | 4 | 13 | 12 | 11 |
| B | 5 | 0 | 5 | 4 | 4 |
| C | 24 | 10 | 21 | 19 | 19 |
| D | 25 | 23 | 23 | 15 | 15 |
| TOTAL | 64 100% | 37 57,81% | 62 96,88% | 50 100% | 49 98% |

Para a verificação estatística de possível associação entre os resultados obtidos, foi aplicado o Teste exato de Fischer, no qual, foi observada a associação significativa ($p < 0,05$) entre a presença de lesão cutânea e nódulos brancacentos no baço (Tabela 8). Ou seja, pode-se afirmar que a presença de lesões de pele pode indicar a presença de nódulos brancacentos no baço, causados pela presença da bactéria Fno.

Tabela 8: Associação entre os resultados obtidos entre lesão cutânea e nódulos brancacentos no baço, nódulos brancacentos no baço e PCR e lesão cutânea e PCR utilizando o Teste exato de Fischer.

| | | Lesão cutânea | | Valor de P* |
|----------------------|---|---------------|----|-------------|
| | | + | - | |
| Nódulos brancacentos | + | 27 | 18 | 0.0159 |
| | - | 0 | 5 | |

| | | Nódulos brancacentos no baço | | Valor de P* |
|-----|---|------------------------------|---|-------------|
| | | + | - | |
| PCR | + | 44 | 5 | 1 |
| | - | 1 | 0 | |

| | | Lesão cutânea | | Valor de P* |
|-----|---|---------------|----|-------------|
| | | + | - | |
| PCR | + | 26 | 23 | 1 |
| | - | 1 | 0 | |

*valores de $p < 0,05$ são considerados significativos

5. DISCUSSÃO

Mesmo que a tilápia seja considerada tolerante a uma grande amplitude de condições ambientais (EL-SAYED, 2006), nesta pesquisa observou-se elevada mortalidade quando houve queda brusca na temperatura ambiental, com mínima de 14,5°C. Acredita-se que as tilápias são mais susceptíveis a infecção por Fno quando há diminuição da temperatura ambiental e da água (SOTO et al., 2010; LEAL et al., 2014).

5.1. Avaliação Anatomopatológica e Histopatológica

O alto índice de múltiplos nódulos brancacentos encontrados no baço, nas tilápias desta pesquisa, tem origem no processo da apresentação do antígeno e formulação de uma resposta adaptativa, com formação de granuloma. Também está envolvido na eliminação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) através de processos de imunidade inata (KIRON, 2012). Nódulos esbranquiçados multifocais em baço, rim e outros órgãos também foram descritos em relatos anteriores com Franciselose (SOTO et al.; 2009, LEAL et al., 2014; JATOBÁ et al., 2016; SEBASTIÃO et al., 2017).

O fato dos peixes estarem imunodebilitados, percebido pela alta mortalidade nos lotes avaliados, permite-se a entrada de novos agentes infecciosos, resultando em lesões de outras partes e órgãos dos animais. As lesões cutâneas são particularmente um desafio no diagnóstico, pois podem ser associadas a vários patógenos e frequentemente torna-se difícil determinar o agente que desencadeou a enfermidade (MOURÃO, 2013). Sabe-se que a infecção da Fno geralmente exhibe poucos sinais externos da doença, mas hemorragias de pele e úlceras podem ocorrer (ALFJORDEN et al. 2006; NYLUND et al. 2006; OTTEM, 2011). Vale destacar que as lesões cutâneas presentes nas tilápias desta pesquisa não foram avaliadas histologicamente,

porém foi possível observar que estas estavam presentes quando havia lesões em pelo menos um dos órgãos.

O elevado número de lesões nos fragmentos de baço de tilápias de lotes com alta mortalidade desta pesquisa, provavelmente se deve à função deste órgão, pois já é de conhecimento que este é a maior massa de tecido linfático do corpo, exercendo diversas funções como formação de células sanguíneas, metabolismo de hemoglobina e ferro, distribuição de hemácias, filtração e armazenamento de sangue além de numerosos neutrófilos e eosinófilos (BANKS, 1992; FISHELSON, 2006; NEYRÃO, 2017).

Uma das reações que podem ser observadas no baço é a formação de centros de melanomacrófagos que são agregados de macrófagos pigmentados por lipofusina, hemossiderina, ceróide e melanina (BALAMURUGAN et al., 2012). Embora sejam achados de peixes saudáveis, os centros de melanomacrófagos aumentam em número com o estresse crônico e eles podem ser encontrados no rim, baço e fígado de peixes (WOLKE, 1992; GENTEN, TERWINGHE, DANGUY, 2009; LEDIC-NETO, 2013).

Muitos estudos sugerem que a função geral destes agregados é a centralização da destruição, desintoxicação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos (FERGUSON, 1976; VOLGELBEIN, FOURNIE, OVERSTREET, 1987; WOLKE, 1992). A formação desses centros, quando apropriadamente analisados, pode evidenciar a resposta de organismos aquáticos diante de agentes estressores, tais como: patógenos; mudanças na temperatura da água; sendo possível considerar que os centros de melanomacrófagos sejam indicadores biológicos de saúde dos peixes (WOLKE, 1985; VOLGELBEIN, FOURNIE, OVERSTREET, 1987; BLAZER et al., 1987; KRANZ, 1989; AGIUS, ROBERTS, 2003; BALAMURUGAN et al., 2012).

O rim tem como função principal a filtragem de sangue e remoção de agentes estranhos (GENTEN, TERWINGHE, DANGUY, 2009), o que pode explicar a alta quantidade de lesões nesse órgão já que as tilápias avaliadas foram confirmadas com a presença da bactéria *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. Em avaliações toxicológicas e ambientais foram descritas alterações

histológicas no rim, como degeneração hialina (CAMARGO, MARTINEZ, 2007), hipertrofia celular (BARRETO, 2007) e congestão renal (ALBINATI et al., 2009).

Degeneração microvesicular (hidrópica), edema celular ou degeneração vacuolar são as primeiras manifestações de quase todas as formas de dano celular, que ocorre pela incapacidade da célula de manter o equilíbrio iônico e a homeostasia de fluidos, em função de falha nas bombas dependentes de energia das membranas celulares (ROBBINS, COTRAN, 2005; LIANG et al., 2009). Algumas das lesões encontradas nos fígados avaliados como congestão, degeneração macrovesicular e necroses estão relacionadas aos processos bacterianos sendo a extensão e gravidade da lesão proporcional ao tipo, duração, severidade da agressão e estado fisiológico da célula envolvida. Além disso, o excesso de ingestão de carboidratos e gordura pode gerar acúmulo de glicogênio nos hepatócitos, dando um aspecto de degeneração microvesicular, que evolui para o acúmulo intracitoplasmático de lipídios, com marginação nuclear (ROBBINS, COTRAN, 2005).

As alterações histopatológicas aparecem como resposta de médio prazo diante de estressores subletais, sendo um método útil para detectar os efeitos de agentes lesivos, em vários órgãos (JOHNSON et al., 1993). Neste caso, as tilápias avaliadas apresentavam processos inflamatórios crônicos na maior parte dos órgãos estudados, sugestivos de infecção bacteriana o que posteriormente foi confirmado pela PCR.

A inflamação crônica granulomatosa pode ser causada por agentes bacterianos sendo a Fno associada a granulomas e alta mortalidade em peixes. Nessa doença, conhecida como Franciselose, há observação de granulomas de vários tamanhos em fígado, rim, baço e em outros tecidos similares com os encontrados nesta pesquisa, porém, esse tipo de lesão também pode ser encontrado em animais infectados por *Flavobacteria* sp., *Mycobacteria* sp., *Nocardia* sp., *Edwardsiella tarda* e *Vibrio* sp. (KLUGE, 1965; TIMUR, ROBERTS, 1977; MIYAZAKI, KAIGE, 1985; COLQUHOUN, DUODU, 2011; BAUMGARTNER, HAWKE, 2011; ALFJORDEN, RUANE, 2015; NGUYEN et al., 2016; ASSIS et al., 2016; HASHISH et al., 2018).

Sabe-se que temperaturas ambientais baixas (16 a 18°C) inibem a habilidade de tilápias em reagir a diferentes patógenos devido à menor velocidade das reações metabólicas corporais e a queda de resposta imune (SOTO et al., 2010; COLQUHOUN, DUODU, 2011; FIGUEIREDO, LOPES, LEAL, 2017). Ressalta-se que as tilápias avaliados foram coletados em um mês com temperaturas mínimas e máximas de 14,5°C e 24°C (INMET, 2017) que é ideal para o crescimento da bactéria *Fno*, causadora de lesões macroscópicas similares ao encontrado nesta pesquisa, com índices de mortalidade também similares (SOTO et al., 2010). Uma pesquisa anterior realizada na mesma região geográfica deste estudo também detectou a presença de *Fno* em tilápias oriundas da região, no entanto, difere-se os relatos de alta mortalidade das tilápias avaliadas neste estudo, como já mencionado, além do fato deste estudo ter sido realizado diretamente na produção e não em frigoríficos (RAGHIANTE, 2016).

5.2. Diagnóstico Molecular por PCR

A ocorrência de 98% de amostras positivas para *Fno* na PCR, confirma a suspeita clínica e o diagnóstico anatomopatológico sugestivo de bacteriose, observado nas mesmas tilápias. Vale ressaltar que esta pesquisa foi desenvolvida a partir de tilápias de criações comerciais, e a infecção por *Fno* foi natural, não experimental. Retrata situação real enfrentada em quatro diferentes locais de produção.

Alguns dos sinais clínicos observados, associados à queda da temperatura ambiental e da água durante as coletas e achados macroscópicos granulomatosos observados no baço das tilápias também foram relacionados à presença de *Fno* em outros estudos (SOTO et al, 2010; LEAL et al., 2014; RAGHIANTE, 2016). Leal et al. (2014) descreveram um aumento da mortalidade no primeiro surto de Franciselose em tilápias, relatado na América do Sul, quando a temperatura da água esteve abaixo de 22°C. O mesmo

observado nesta pesquisa, já que as tilápias avaliadas foram coletas em um mês com temperaturas mínimas e máximas de 14,5°C e 24°C (INMET, 2017).

A pesquisa de Fno em peixes é relatada por diversos autores como descrito na Tabela 9.

Tabela 9. Pesquisa de detecção de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em tilápias (*Oreochromis niloticus*) nos últimos anos.

| Local | Nº de amostras | Dignóstico | Ocorrência (%) | Referências |
|---|----------------|---------------------|---------------------------|-------------------------|
| Minas Gerais, Brasil | 44 | Bacteriológico PCR | 100 | Leal et al. (2014) |
| Joinville, Santa Catarina, Brasil | 16 | Bacteriológico PCR | 50,0 62,5 | Jatobá et al. (2016) |
| São Paulo e Minas Gerais, Brasil | 559 | Bacteriológico PCR | 1,6 a 74,4 48,8 a 99,5 | Assis et al. (2016) |
| Rio Araguari, MG, Brasil | 150 | PCR | 4 | Raghianti (2016) |
| Oeste do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, Brasil | 27 | PCR | 88,8 | Sebastião et al. (2017) |
| São Paulo, Brasil | 360 | Histopatológico PCR | 0 a 86,66 | Rodrigues et al. (2018) |

A presença de nódulos brancacentos (granuloma) de tamanhos variáveis em órgãos como baço, fígado e rim são descritos em diversas pesquisas sobre a franciselose em peixes (OLSEN et al. 2006; COLQUHOUN, DUODU, 2011; ALFJORDEN, RUANE, 2015; NGUYEN et al., 2016). Entretanto, há relatos de não observação das lesões granulomatosas em casos confirmados da presença de Fno (KAMAISHI et al., 2010; RODRIGUES et al, 2018), o que pode justificar a ausência desta alteração patológica em 10% (05/50) das tilápias avaliadas. Vale ressaltar que a ausência de nódulos ou granulomas na necropsia não excluiu a possibilidade de infecção por Fno, já que nestes 10% de tilápias avaliadas, e sem nódulos, foram confirmadas com Fno no PCR.

Lesões cutâneas em peixes infectados por Fno têm sido descritas na literatura (MAUEL et al., 2005; LEAL et al., 2014; RODRIGUES et al, 2018). Nesta pesquisa 54% (27/50) dos peixes positivos para Fno na PCR apresentaram lesões cutâneas. Estes autores citados relatam que o fato da franciselose deixar os peixes imunodebilitados, permite-se a instalação de infecções secundárias onde novos agentes infecciosos, podem ser oportunistas e causarem lesões em órgãos de animais, como a pele.

O fato de apenas uma tilápia avaliada não ter sido positiva para Fno pela PCR não descarta a possibilidade da franciselose neste indivíduo já que durante a necropsia foi observada a presença de nódulos brancos (granuloma) no baço e lesão cutânea, característicos desta doença.

Raghiante (2016) encontrou uma prevalência de 4% de *Francisella* spp. em uma coleta aleatória de 150 amostras de baços de tilápias em frigoríficos, oriundos da região do rio Araguari, entretanto, as coletas da autora foram realizadas em frigoríficos.

Com o resultado obtido no teste estatístico de Fischer é possível instruir os produtores e profissionais da área, que, a presença de lesões cutâneas em juvenis de tilápia nos meses mais frios do ano, também pode ser sugestiva de infecção por *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*.

Como já relatado nesta e em outras pesquisas aqui citadas, a presença da Franciselose em peixes está relacionada com a diminuição de temperatura do ambiente e da água. Esta informação, associada ao fato da Fno ser capaz de causar lesões cutâneas, como comprovado por este estudo, permite ainda que na produção, os profissionais responsáveis pela produção ao identificarem lesões cutâneas em tilápias, em épocas com baixas de temperaturas, suspeitem da presença da doença e adotem medidas preventivas, visando redução da mortalidade na piscicultura.

No Brasil, atualmente apenas dois antimicrobianos são legalizados para uso na aquicultura, a oxitetraciclina e o florfenicol, os quais muitas vezes são ineficazes em alguns casos (ASSANE, 2018). Soto et al. (2010) ao avaliarem a eficácia terapêutica do florfenicol no tratamento da infecção por *Francisella asiatica* em tilápia-do-Nilo afirmaram que se o florfenicol for administrado

durante os estágios iniciais da infecção, detectada por um rápido diagnóstico, possui o potencial de tratar efetivamente a Franciselose dos peixes. Diante disso, orienta-se os produtores que ao sinal de qualquer suspeita, deve-se enviar amostras para o diagnóstico com o uso de PCR em laboratório.

A excelente capacidade de reprodução em tilápias e a aceitação da carne pelo mercado consumidor fazem com que esta espécie apresente grande potencial aquícola no mundo. No entanto, com tantos relatos, percebe-se que tilápia é mais susceptível à Fno, quando comparada a outras espécies de peixes. Os mecanismos de patogenicidade da Fno não são totalmente conhecidos e, sabe-se que estas bactérias apresentam uma expressiva taxa de infectividade e notável habilidade em persistir no ambiente (SOTO et al., 2015). De qualquer forma, devem-se redobrar cuidados adotando-se medidas de biossegurança na criação de tilápias.

Em um estudo realizado por Dong et al. (2016), ao realizar a injeção intraperitoneal de Fno em panga (*Pangasianodon hypophthalmus*), carpas (*Cyprinus carpio*) e tilápia (*Oreochromis* sp.), a fim de avaliar a suscetibilidade a Fno, concluíram que a hibridização *in situ* revelou sinais Fno-positivos fracos no baço infectado de panga e carpa, mas mostrou forte reatividade na tilápia infectada, sugerindo que os bagres listrados e carpa comum não são susceptíveis à Franciselose.

A Franciselose também já foi descrita no bacalhau-do-atlântico (*Gadus morhua*) (ELLINGSEN et al., 2011) que confirmaram, através da imunohistoquímica e PCR em tempo real, a transmissão da franciselose pela água. No referente estudo, ao transferir a água de um tanque contendo o bacalhau infectado intraperitonealmente para um tanque com o peixe de mesma espécie, porém saudável, o peixe saudável apresentou respostas de anticorpos específicos e inflamatórias diante da presença de Fno.

A comprovação da transmissão pela água da Fno entre peixes, por Ellingsen et al. (2011), e, o fato de já se ter o relato da bactéria Fno em tilápias coletadas em frigorífico, oriundas da mesma região geográfica deste estudo (RAGHIANTE, 2016), surege a hipótese de que a infecção por Fno, de forma natural, nas tilápias avaliadas, criadas em tanques-rede, possa ter ocorrido

através de transmissão pelas águas da bacia hidrográfica do Rio Araguari, MG. Além disso, vale ressaltar que as tilápias avaliadas neste estudo, foram criadas em tanques-rede e que, alguns autores afirmam que este sistema de produção possibilita a introdução de patógenos, circulantes pela água (TEIXEIRA, 2006; MORI, 2012). Este fato é de suma importância servindo como um alerta para a piscicultura brasileira e sugestivo para futuros estudos em espécies de peixes nativos da região.

Não há relatos na literatura de doenças em seres humanos causadas por *Francisella noatunensis* subsp. *Orientalis*. Entretanto, pesquisas feitas com outras espécies de *Francisella* spp., confirmam que alguns agentes deste grupo bacteriano são causadores de doenças zoonóticas, como é o caso da *Francisella tularensis*, causadora da tularemia em homens (CLEMENS, LEE, HORWITZ, 2018; WILLIAMSON et al, 2017) e que há semelhanças genéticas entre as espécies zoonóticas e àquelas que ainda não se tem comparação (NYLUND et al., 2006). Williamson et al. (2017) em estudos com *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* relatam sobre a existência de surtos de tularemia por via aquática em pelo menos dez países e que a contaminação da água, originou-se de carcaças ou excretas de animais infectados. Há relatos da bactéria *F. philomiragia*, anteriormente conhecida como *Yersinia philomiragia*, isolada de casos de doença humana (WENGER et al., 1989).

A confirmação da presença de Fno por PCR nas tilápias criadas em tanque-rede, avaliadas nesta pesquisa, ressalta a importância de se realizar, efetivamente, a inspeção sanitária dos peixes em pisciculturas e frigoríficos, sabendo que há espécies zoonóticas de *Francisella* spp. e que ainda não se sabe, quanto ao potencial zoonótico de todas as espécies. Além do mais, o consumo do peixe cru, introduzido no Brasil pela cultura japonesa, aumenta a possibilidade de doenças transmitidas por alimentos nos seres humanos.

Devido ao aumento de produção e do consumo da carne de peixe e sabendo que há espécies zoonóticas de *Francisella* spp., sugere-se novas pesquisas para avaliar o potencial zoonótico das diversas espécies deste gênero bacteriano, principalmente da Fno, encontrada em tilápias. Vale ressaltar que neste estudo, algumas tilápias não apresentaram lesões

macroscópicas observadas na necropsia, entretanto, foram positivos para Fno no PCR e que há espécies de *Francisella* spp. causadoras de doenças zoonóticas. Sugere-se ainda que novos estudos sejam realizados para avaliar se há a presença da Fno em peixes de espécies nativas, que talvez não apresentem sinais característicos da franciselose mas servem de hospedeiro da bactéria, aumentando o risco de contaminações de tilápias em sistemas de produção em tanques-rede.

6. CONCLUSÃO

O destaque desta pesquisa é o alto índice de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em tilápias cultivadas em tanques-rede pertencentes a Bacia do Rio Araguari, MG, caracterizando um surto, no mês de Julho de 2017. Este fato serve de alerta para a piscicultura brasileira e principalmente para os produtores da região.

Pode-se afirmar que a presença de lesões cutâneas em tilápias associada a nódulos brancacentos (granulomas) no baço pode indicar a presença de Fno em tilápias em condições de baixa temperatura ambiental. Sendo assim, indica-se aos produtores que ao sinal de qualquer suspeita, deve-se enviar amostras para o diagnóstico rápido, como a PCR, em laboratório, a fim de se evitar maiores perdas na piscicultura.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugerem-se novas pesquisas para investigações quanto à patogenia e ao potencial zoonótico das diversas espécies de *Francisella* spp. e quanto à presença desta bactéria em outras espécies de peixes nativos da região da bacia do Rio Araguari, MG.

REFERÊNCIAS

AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Melanomacrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**. v. 26, p. 499–509, 2003.

ALBINATI, A.C.L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B.; CARVALHO, J.V.; DE LIRA, A.D.; SANTOS, G.B.; VIDAL, L.V.O. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61,n.3,p.621-627, 2009.

ALFJORDEN, A.; JANSSON, E.; JOHANSSON, K.E. **A systemic granulomatous inflammatory disease in wild Atlantic cod, *Gadus morhua* associated with a bacterium of the genus *Francisella***. DIPNET, Disease interaction and pathogen exchange between farmed and wild aquatic animal population, A European network, Newsletter 44. 2006.

ALFJORDEN, A.; RUANE, N. Francisellosis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish**. v.64, n.5, 2015. Acesso em 13.10.2017. Disponível em: <pphttp://ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Disease%20Leaflets/Sheet%20No.%2064.pdf>.

AMARAL, A.F.; ALVARADO, N.; MARIGOMEZ, I.; CUNHA, R.; HYLLAND, K.; SOTO, M. Autometallography and metallothionein immunohistochemistry in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) after exposure to cadmium and depuration treatment. **Biomarkers**. v.7, p.491-500, 2002.

ANDA, P.; DEL POZO, J.S.; GARCIA, J.M.D.; ESCUDERO, R.; GARCIA PEÑA, F.J.; LÓPEZ VELASCO, M.C.; SELLEK, R.E.; JIMÉNEZ CHILLARÓN, M.R.; SANCHEZ SERRANO, L.P.; MARTINEZ NAVARRO, J.F. Waterborne

outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. **Emerging Infectious Diseases** v.7,p.575–582, 2001

ASSANE, I.M. **Atividade antimicrobiana do tianfenicol sobre bactérias patogênicas de peixes**. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP. Jaboticabal, SP. 79p, 2018.

ASSIS, G.B.N.; OLIVEIRA, T.F.; FIGUEIREDO, H.C.; LEAL, C.A.G. Sensitivity and specificity of real-time PCR and bacteriological culture for francisellosis in farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Journal of Fish Diseases**. v.40,p.785-795, 2016

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA (PEIXEBR). **Anuário Peixe BR da Piscicultura**. 2018. Disponível em: www.peixebr.com.br. Acesso em 28 de maio de 2018.

BALAMURUGAN, S.; DEIVASIGAMANI, B.; KUMARAN, S.; SAKTHIVEL, M.; RAJSEKAR, T.; PRIYADHARSINI, P. Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bioindicator of environmental change. **Asian Pacific Journal of Tropical Diseases**. S635-S638, 2012.

BALARIN, J.D.; HALLER, R.D. The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and cages. In: Muir JF, Roberts RJ. (eds) **Recent Advances in Aquaculture**. Croom Helm, London and Canberra, and Westview Press, Boulder, Colorado. p.267–355, 1982.

BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 2ed. São Paulo Editora Monole Ltda, p.629, 1992.

BARNS, S.M.; GROW, C.C.; OKINAKA, R.T.; KEIM, P.; KUSKE, C.R. Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples. **Applied Environmental Microbiology** v.71,p.5494–5500, 2005

BARRETO, T.R. **Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR®).** Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 105p., 2007.

BAUMGARTNER, W.A.; HAWKE, J. Bacterial diseases cause granulomas in fish: Varied staining methods identify pathogens. **Global Aquaculture Alliance**. p.34-35. Jul/aug, 2011.

BIRKBECK, T.H., BORDEVIK, M., FROYSTAD, M.K., BAKLIEN, A. Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. **Journal of. Fish Diseases**. v. 30,p. 505–507, 2007.

BIRKBECK, T.H.; FEIST, S.W.; VERNER-JEFFREYS, D.W. Francisella infections in fish and shellfish. **Journal of Fish Diseases**. v. 34,p. 173–187, 2011.

BITTENCOURT, F.; SOUZA, B.E.; BOSCOLO, W.R.; RORATO, R.R.; FEIDEN, A.; NEU, D.H. Benzocaína e eugenol como anestésicos para o quinguio (*Carassius auratus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.64,n.6,p.1597-1602, 2012.

BLAZER, V.S.; WOLKE, R.E.; BROWN, J.; POWELL, C.A. Piscine macrophage aggregate parameters as health monitors: effects of age, sex, relative weight, season and site quality in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquatic Toxicology**. v.10,p.199-215, 1987.

BREVIK, O.J.; OTTEM, K.F.; KAMAISHI, T.; WATANABE, K.; NYLUND, A. *Francisella haliotida* sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. **Journal Applied Microbiology**. v. 111, p.1044–1056, 2011.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**. v.5,n.3,p. 327-336, 2007.

CHEN, S.C.; TUNG, M.C.; CHEN, S.P.; TSAI, J.F.; WANG, P.C.; CHEN, R.S.; LIN, S.C.; ADAMS, A. Systematic granulomas caused by a rickettsia-like organism in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), from southern Taiwan. **Journal of Fish Diseases** v.17,p.591–599, 1994

CHERN, R.S.; CHAO, C.B. Outbreaks of a disease caused by rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan. **Fish Pathology** v.29,p.61–71, 1994

CHERVINSKI, J. Environmental physiology of tilapias. In: Pullin RVS, Lowe-McConnell RH. (eds) **The Biology and Culture of Tilapias**. ICLARM Conference Proceedings, ICLARM, Manila, Philippines. v. 7,p.119–128, 1982.

CLEMENS, D.L.; LEE, B.Y.; HORWITZ, M.A. The *Francisella* Type VI Secretion System. **Frontiers in Cellular and infection microbiology**. v.8, p.121, 2018.

COLQUHOUN, D.J.; DUODU, S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. **Veterinary Research**. p.42-47, 2011. Acesso em 13.10.2017. Disponível em <<http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/47>>.

COSTA, F.A.A.; LEAL, C.A.G.; LEITE, R.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. Genotyping of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**. v.37,n.5, p. 463-469, 2014.

DONG, H.T.; NGUYEN, V.V.; KAYANSAMRUJ, P.; GANGNONNGIW, W.; SENAPIN, S.; PIRARAT, N.; NILUBOL, D.; RODKHUM, C. *Francisella noatunensis subsp. orientalis* infects striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and common carp (*Cyprinus carpio*) but does not kill the hosts. **Aquaculture**. v.464, p. 190–195, 2016.

DUODU, S.; LARSSON, P.; SJOËDIN, A.; SOTO, E.; FORSMAN, M.; COLQUHOUN, D.J. Real-time PCR assays targeting unique DNA sequences of fish-pathogenic *Francisella noatunensis* subspecies *noatunensis* and *orientalis*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 2012; v.101, p. 225-234, 2012.

EL-SAYED, A.F.M. Tilapia Culture. **CABI International Publishing**. UK. 293p., 2006.

EL-SHAROUNY, H.M.; BADRAN, R.A.M. Experimental transmission and pathogenicity of some zoosporic fungi to tilapia fish. **Mycopathologia**. v.132,p. 95–103, 1995.

ELLINGSEN, T.; INAMI, M.; GJESSING, M.C.; VAN NIEUWENHOVE, K.; LARSEN, R.; SEPPOLA, M.; LUND, V.; SCHRODER, M.B. *Francisella noatunensis* in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.); waterborne transmission and immune responses. **Fish Shellfish Immunology**. v.31,n.2, p. 326-33, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Embrapa pesca e aquicultura. **Diagnóstico da Cadeia de valor da tilapicultura no Brasil**. Brasília, DF, 181p., 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Cultured Aquatic Species Information Programme. Rakocy JE. In: **FAO Fisheries and Aquaculture Department** (online). Rome. 2005. Acesso em: 15 de Outubro de 2017. Disponível em <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en>.

FERGUSON, H.W. The relationship between ellipoids and melanomacrophage centers in the spleen of turbot, (*Scophthalmus maximus*). **Journal of Comparative Pathology**. v. 86, p. 377-380, 1976.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LOPES, C.O.; LEAL, C.A.G. Imunidade de animais aquáticos. **Sanidade Aquícola** (online). v.106, mar-abr, 2008. Acesso em 07 de Outubro de 2017. Disponível em:
<<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/Revistas/106/Sanidade106.asp>>

FISHELSON L. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (*Apogonidae, Teleostei*) as bioindicators of stress. **Journal of Morphology**. v. 267, p. 57–69, 2006.

GENTEN F, TERWINGHE E, DANGUY A. **Atlas of fish histology**. Department of Histology and Biopathology of Fish Fauna, Laboratory of Functionnal Morphology, Université Libre de Bruxelles (U.L.B) Brussels Belgium. v. 5, p.57-63, 2009.

GONÇALVES, L.A. **Genômica comparativa de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Programa interunidades de pós-graduação em bioinformática. Belo Horizonte. 84p., 2015.

HASHISH, E.; MERWAD, A.; ELGAML, S.; AMER, A.; KAMAL, H.; ELSADEK, A.; MAREI, A.; SITOHY, M. *Mycobacterium marinum* infection in fish and man: epidemiology, pathophysiology and management; a review. **Veterinary Quartely**. v.38, n.10, p.35-46, 2018.

HOLLIS, D.G., WEAVER, R.E., STEIGERWALT, A.G., WENGER, J.D., MOSS, C.W., BRENNER, D.J. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia*

philomiragia) and *Francisella tularensis* biogroup novicida (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. **Journal of Clinical Microbiology** v.27, p.1601–1608, 1989.

HSIEH CY, TUNG MC, TU C, CHANG CD, TSAI SS. Enzootics of visceral granulomas associated with *Francisella*-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.). **Aquaculture**. v.254, p.129-138, 2006.

HSIEH, C.Y., WU, Z.B., TUNG, M.C., TSAI, S.S. PCR and in situ hybridization for the detection and localization of a new pathogen *Francisella*-like bacterium (FLB) in ornamental cichlids. **Diseases of Aquatics. Organisms**. V.75, p. 29–36, 2007.

HUBER, B.; ESCUDERO, R.; BUSSE, H.J.; SEIBOLD, E.; SCHOLZ, H.C.; ANDA, P.; KÄMPFER, P.; SPLETTSTOESSER, W.D. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al., 1955) Olsufiev et al., 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. **International Journal of Systematic Evolutionary. Microbiology**. V.60, p.1887–1896, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) **Produção da Pecuária Municipal**, v.42, 2015.

INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS (IGAM). **Mapoteca. Bacias Hidrográficas**. 2018. Acesso em 16 de maio de 2018. Disponível em: <http://www.igam.mg.gov.br/geoprocessamento>.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). **Estação de Uberlândia**. Temperatura no período de 01 de Julho de 2017 a 31 de Julho de 2017. Acesso em 09.10.2017. Disponível em:

<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf>.

JATOBÁ, A., KLIPP, S.P., HOPPE, R. Primeiro relato de *Francisella noatunensis* subespécie *orientalis* no sul do Brasil – relato de caso. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.10, n.2, p.172-176, 2016.

JEFFERY, K.R.; STONE, D.; FEIST, S.W.; VERNER-JEFFREYS, D.W. An outbreak of disease caused by *Francisella* sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. **Diseases of Aquatic Organisms** v.91, p.161–165, 2010.

JOHNSON, L.L.; STEHR, C.M.; OLSON, O.P.; MYERS, M.S.; PIERCE, S.M.; WIGREN, C.A.; MCCAIN, B.B.; VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. **Environmental Science and Technology**. v.27, p.2759-2771, 1993.

JORDE, L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M.J. **Medical Genetics**. 5th Edition. Elsevier. 2010.

KAMAISHI, T.; FUKUDA, Y.; NISHIYAMA, M.; KAWAKAMI, H.; MATSUYAMA, T.; YOSHINAGA, T.; OSEKO, N. Identification and pathogenicity of intracellular *Francisella* bacterium in three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*. **Fish Pathology**. V.40, p.67–71, 2005.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**. v.173, p.111-133, 2012.

KLUGE JP. A granulomatous disease of fish produced by flavobacateria. **Veterinary Pathology**. v. 2, p.545-552, 1965.

KRANZ H. Change in splenic melano-macrophage centres of dab, *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. **Diseases of Aquatic Organisms**. V.6, p.167-173, 1989.

KUBITZA, F. Tilápias na mira dos patógenos. **Panorama da Aquicultura**, v.18, n.107, p.28-37. 2008.

KULKARNI, A.; MARLOWE, A.; CAIPANG, A.; KORSNES, K.; BRINCHMANN, M.F.; KIRON, V. Molecular diagnosis of francisellosis, a systemic granulomatous inflammatory disease in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Veterinary Research Communications**, v.35, p.67–77. 2011.

LAMPE, E.O.; ZINGMARK, C.; TANDBERG, J.I.; THRANE, I.M.P.; BRUDAL, E.; SJÖSTEDT, A.; WINTHER-LARSEN, H.C. *Francisella noatunensis subspecies noatunensis* clpB deletion mutante impairs development of francisellosis in a zebrafish model. **Vaccine**. V.35, p.7264–7272, 2017.

LEAL, C.A.; TAVARES, G.C.; FIGUEIREDO, H.C. Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis subsp orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Genetic and Molecular Research**. Jul 25;v.13, n.3, p.5704-12, 2014.

LEDIC-NETO, J. **Hematologia e histologia de tilápia do Nilo alimentada com própolis na dieta**. Dissertação de Mestrado no Programa de Pós graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 58p., 2013.

LIANG, D.; BHATTA, S.; GERZANICH, V.; SIMARD, J.M. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. **Neurosurg Focus**. V. 22, n. 5,p. E2 01-17, 2009.

MARTINS, A.M.C.R.P.F.; CATROXO, M.H.B.; HIPOLITO, M. *Francisella* spp.: a bactéria emergente responsável por massiva mortalidade na aquicultura.

Arquivos do Instituto Biológico. p. 216. 2015.

MAUEL, M.J.; MILLER, D.L.; STYER, E.; POUDER, D.N.; YANONG, R.P.E.; GOODWIN, A.E.; SCHWEDLER, T.E. Occurrence of Piscirickettsiosis-like syndrome in tilapia in the continental United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** v.17, p.601–605, 2005.

MESQUITA, R.C.T.; MASCHIO, D.; ELOY, L.; GODOY, L.; PAZ, E.M.; STREIT, D.P. Vantagens do cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com mínima liberação de efluentes. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal.** V.10, n.3,p. 447–454, 2016.

MIYAZAKI, C.F.; KAIGE, N. Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. **Fish Pathology.** V.20, n. 2-3, p 219-227, 1985.

MORI, R. H. **Prevalência de ectoparasitos e diagnóstico bacteriológico em tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) da variedade gift, cultivadas em tanques-rede no rio do corvo – PR.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Área de concentração: produção animal, Maringá, 36p., 2012.

MOURÃO, L.C. **Doenças bacterianas em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em sistema intensivo.** Monografia do Curso de Medicina Veterinária em Betim da Pontífica Universidade Católica de Minas Gerais. Betim, MG. 73p., 2013.

NEYRÃO, I.M. **Mediação de respostas imunes e do sistema de defesa antioxidante pelo cortisol em pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura. 58p., 2017.

NIEBYLSKI, M.L.; PEACOCK, M.G.; FISHER, E.R.; PORCELLA, S.F.; SCHWAN, T.G. Characterization of an endosymbiont infecting wood ticks, *Dermacentor andersoni*, as a member of the Genus *Francisella*. **Applied and Environmental Microbiology** v.63, p.3933–3940, 1997.

NGUYEN, V.V.; DONG, H.T.; SENAPIN, S.; PIRARAT, N.; RODKHUM, C. *Francisella noatunensis subsp. orientalis*, an emerging bacterial pathogen affecting cultured red tilapia (*Oreochromis* sp.) in Thailand. **Aquaculture Research**.v. 47, p. 3697–3702, 2016.

NODA, H.; MUNDERLOH, U.G.; KURTTI, T.J. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. **Applied and Environmental Microbiology** v.63,p.3926–3932, 1997.

NOGUEIRA, A.; RODRIGUES, T. Criação de tilápias em tanques-rede. **SEBRAE**, Salvador, Bahia. 23p., 2007

NYLUND, A.; OTTEM, K.F.; WATANABE, K.;KARLSBAKK, E.; KROSSOY, B. *Francisella* sp. (Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. **Archives Microbiology** v.185,p.383–392, 2006.

OLIVEIRA, E.G.; SANTOS, F.J.S.; PEREIRA, A.M.L.; LIMA, C.B. Produção de Tilápia: mercado, espécie, biologia, e recria. **Circular Técnica**, v. 45, n12, p. 1-12, 2007.

OKAEME, N.A.; OLUFEMI, B.E. Fungi associated with tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture ponds in Nigeria. **Journal of Aquaculture in the Tropics**. V.12,p. 267–274, 1997.

OLSEN, A.B.; MIKALSEN, J.; RODE, M.; ALFJORDEN, A.; HOEL, E.; STRAUM-LIE, K.; HALDORSEN, R.; COLQUHOUN, D.J. A novel systemic

granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. **Journal of Fish Diseases**. v.29, p. 307–311, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL (OIE). **Antimicrobial resistance (AMR)**. 2018. Acesso em: 28 de maio de 2018. Disponível em: <http://www.oie.int/en/for-the-media/amr/international-collaboration/>.

ORTEGA, C.; MANCERA, G.; ENRIQUEZ, R.; VARGAS, A.; MARTINEZ, S.; FAJARDI, R.; VENDAÑO-HERRERA, R.; NAVARRETE, M.J.; ROMERO, A. First identification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* causing mortality in Mexican tilapia *Oreochromis spp.* **Diseases of Aquatics Organisms**. v.120, p. 205-215, 2016.

OSTLAND, V.E.; STANNARD, J.A.; CREEK, J.J.; HEDRICK, R.P.; FERGUSON, H.W.; CARLBERG, J.M.; WESTERMAN, M.E. Aquatic *Francisella*-like bacterium associated with mortality of intensively cultured hybrid striped bass *Morone chrysops* × *M. saxatilis*. **Diseases of Aquatics Organisms**. V.72, p. 135–145, 2006.

OTTEM, K.F.; NYLUND, A.; KARLSBAKK, E.; FRIIS-MOLLER, A.; KAMAISHI, T. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two importante fish pathogens. **Journal of Applied Microbiology**. V.106,p. 1231–1243, 2009.

OTTEM, K.F. ***Francisella noatunensis* – Taxonomy and ecology**. Tese de Doutorado. University of Bergen, Norway , 143p., 2011.

QIANG, L.; NINGQIU, L.; XIAOZHE, F.; QIANDONG, H.; CHANG, O.; LIHUI, L.; ZHANG, D.; WANG, G.; SAN, G.; WU, S. An outbreak or granulomatous

inflammation associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in China. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**. v.34, p. 460-466, 2015.

RAMIREZ-PAREDES, J.G.; THOMPSON, K.D.; METSELAAR, M.; SHAHIN, K.; SOTO, E.; RICHARD, R.H.; PENMAN, D.J.; COLQUHOUN, D.J.; ADAMS, A. A polyphasic approach for phenotypic and genetic characterisation of the fastidious aquatic pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. **Frontiers in Microbiology**. V. 12, 2017. Acesso em: 15 de Maio de 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02324> PMID: 29312155

RAGHIANTE, F.; FERRASSO, M.M.; RODRIGUES, M.V.; BIONDI, G.F.; MARTINS, O.A. *Francisella* spp. em tilápias no Brasil: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. Jan-mar,v.11, n.1, p. 119-130, 2017.

RAGHIANTE, F. ***Francisella noatunensis orientalis* em tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em tanques-rede na bacia hidrográfica do rio Araguari – Minas Gerais**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”. Botucatu, SP. 64 p., 2016.

ROBBINS, S.; COTRAN, R.S. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. (Eds) Elsevier: Rio de Janeiro. 1592p., 2005.

RODRIGUES, M.V.; FRANCISCO, C.J.; DAVID, G.S.; SILVA, R.J.; FALCONE-DIAS, M.F.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Monitoring of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Aquaculture International**. v. 26, n. 1, p. 127-138, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-017-0204-4>

SAMBROOK, J.F.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2100p., 2001.

SARAIVA, A. Aspectos gerais de histologia e de histopatologia de peixes. In: Silva-Souza AT. (org) **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Maringá. 239-252, 2006.

SCOLES, G.A. Phylogenetic analysis of the *Francisella*-like endosymbionts of *Dermacentor* ticks. **Journal of Medical Entomology**. v.41, p. 277–286, 2004.

SEBASTIÃO, F.A.; PILARSKI, F.; KEARNEY, M.T.; SOTO, E. Molecular detection of *Francisella noatunensis subsp. orientalis* in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in three Brazilian states. **Journal of Fish Diseases**, n. May, p. 1–5, 2017. Disponível em: <
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jfd.12636>>

SILVA, B.C. **Septicemia hemorrágica em Surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* macho x *P. fasciatum* fêmea) causada por *Aeromonas hydrophila***. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis. 62p., 2010.

SOTO, E.; HAWKE, J.P.; FERNANDEZ, D.; MORALES, J.A. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Costa Rica. **Journal of Fish Diseases**. V.32, p. 713-722, 2009. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01070.x> PMID: 19515205>

SOTO, E.; BOWLES, K.; FERNANDEZ, D.; HAWKE, J.P. Development of a real-time PCR assay for identification and quantification of the fish pathogen *Francisella noatunensis subsp. orientalis*. **Diseases of Aquatic Organisms**. V.89, p. 199-207, 2010.

SOTO, E.; ILLANES, O.; HILCHIE, D.; MORALES, J.A.; SUNYAKUMTHORN, P.; HAWKE, J.P.; GOODWIN, A.E.; RIGGS, A.; YANONG, R.P.; POUDER, D.B.; FRANCIS-FLOYD, R.; ARAUZ, M.; BOGDANOVIC, L.; CASTILLO-ALCALA, F. Molecular and immunohistochemical diagnosis of *Francisella noatunensis subsp orientalis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. V.24, p.840–845, 2012.

SOTO, E.; PRIMUS, A.E.; POUDER, D.B.; EORGE, R.H.; GERLACH, T.J.; CASSLE, S.E.; JOHNSON, T.; BOYD, S.; HANDSEL, T.; YANONG, R.P. Identification of *Francisella noatunensis* in novel host species French grunt (*Haemulon Flavolineatum*) and Caesar grunt (*Haemulon carbonarium*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.45, n.3, p.727–731, 2014.

SUITOR, E.C.; WEISS, E. Isolation of a rickettsia like microorganism (*Wolbachia persica*, n.sp.) from *Argas persicus* (Oken). **Journal of Infection Diseases**. V.108, p.:95–106, 1961.

TAVARES-DIAS M. Manejo e sanidade de peixes em cultivo (online). Macapá: **Embrapa Amapá**. 724p., 2009.

TEIXEIRA, A.L.C.M. **Estudo da viabilidade técnica e econômica do cultivo de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus*, linhagem chitralada, em tanques-rede com duas densidades de estocagem**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 63p., Ago. 2006. Disponível em: <<http://www.pgpa.ufrpe.br/Trabalhos/2006/T2006alcmt.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

TIMUR, G.; ROBERTS, R.J. The experimental pathogenesis of focal tuberculosis in the plaice (*Peuronectes platessa*). **Journal of Comparative Pathology**. V.87, n.1, p. 83-87, 1977.

TREWAVAS, E. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. **Bulletin of the British Museum (Natural History)**. London, UK. 583 p., 1983.

VALLADÃO, G.M.R.; LEVY-PEREIRA, N.; VIADANNA, P.H.O.; GALLANI, S.U.; FARIAS, T.H.V.; PILARSKI, F. Haematology and histopathology of Nile tilapia parasitised by *Epistylis* sp., na emerging pathogen in South America. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**. V.35, n.1, p. 14-20, 2014.

VOLGELBEIN, W.K.; FOURNIE, J.W.; OVERSTREET, R.M. Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic menano-macrophage centers in *Rivulus marmoratus*. **Journal of Fish Biology**. V.31, p. 145-153, 1987.

WENGER, J.D.; HOLLIS, D.G.; WEAVER, R.E.; BAKER, C.N.; BROWN, G.R.; BRENNER, D.J.; BROOME, C.V. Infection caused by *Francisella philomiragia* (formerly *Yersinia philomiragia*) a newly recognized human pathogen. **Annals of Internal Medicine**. v. 110, p. 888–892, 1989.

WILLIAMSON, D.R.; DEWAN, K.K.; PATEL, T.; WASTELLA, C.M.; NING, G. Kirimanjeswara, G.S. A Single Mechanosensitive Channel Protects *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* from Hypoosmotic Shock and Promotes Survival in the Aquatic Environment. **Applied and Environmental Microbiology**. V.84, n5, e02203-17, 2017. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/early/2017/12/18/AEM.02203-17>.

WOLKE, R.E. Piscine macrophage aggregates: a review. **Annual Review of Fish Diseases**. v.2, p. 91-108, 1992.

WOLKE, R.E.; MURCHELANO, R.A.; DICKTEIN, C.; GEORGE, C.J.

Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. V.35, p. 222-227, 1985.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Investigação do envolvimento de *Francisella* sp. em tilápias com alterações de comportamento e alto índice de mortalidade produzidas em tanque rede na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba”, protocolo nº 079/17, sob a responsabilidade de **Anna Monteiro Correia Lima** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBÉRLÂNDIA, em reunião 20 de outubro de 2017.

(We certify that the project entitled “Investigação do envolvimento de *Francisella* sp. em tilápias com alterações de comportamento e alto índice de mortalidade produzidas em tanque rede na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba”, protocol 079/17, under the responsibility of **Anna Monteiro Correia Lima** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBÉRLÂNDIA, in meeting of October 20th, 2017).

| | |
|---|--|
| Vigência do Projeto | Início: 20/11/2017 Término: 15/03/2018 |
| Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos | Tilápia |
| Número de animais | 50 |
| Peso / Idade | 50 a 200gr/Juvenil |
| Sexo | Fêmeas e Machos |
| Origem / Local | Criatórios de tilápias em tanques-redes da região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. |
| Número da Autorização SISBIO | - |
| Atividade(s) | - |

Uberlândia, 06 de novembro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFG