

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ZONÓTICOS EM
FILÉS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

BRUNO GIORNO EBERHARDT

Botucatu – SP
Março/2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ZONÓTICOS EM
FILÉS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

BRUNO GIORNO EBERHARDT

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni
Coorientador: Prof. Dra. Marianna Vaz Rodrigues

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Eberhardt, Bruno Giorno.

Avaliação de micro-organismos zoonóticos em filés de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) / Bruno Giorno Eberhardt. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Helio Langoni

Coorientador: Marianna Vaz Rodrigues

Capes: 50505009

1. *Aeromonas hydrophila*. 2. *Edwardsiella tarda*. 3. Microbactérias não tuberculosas. 4. Cianobactéria. 5. Tilápia-do-Nilo.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*; *Edwardsiella tarda*; *Mycobacterium gordonae*; cianobactéria; tilápia do Nilo.

Nome do Autor: Bruno Giorno Eberhardt

Título: **AVALIAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ZONÓTICOS EM FILÉS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Helio Langoni
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Marcio Garcia Ribeiro
Membro
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP - Botucatu

Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim
Membro
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAPA – Brasil

Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia Mores Rall
Membro
Departamento de Microbiologia e Imunologia
IBB – UNESP - Botucatu

Prof.^a Dr.^a Simone Baldini Lucheis
Membro
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
APTA – Bauru – São Paulo

Data da Defesa: 01 de Março de 2018.

DEDICO

A meus pais, Paulo (*in memoriam*) e Tereza Cristina;

À minha esposa, Vanessa, e a meus filhos, Julia e Gustavo.

AGRADECIMENTOS

Ao longo do período de realização deste trabalho, pude contar com a preciosa ajuda e orientação de colegas e familiares. A estes, gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos:

Primeiramente, a Deus, por todos os bons e maus momentos decorridos em minha vida, os quais me fortaleceram e ensinaram aquilo que não pode ser aprendido nos livros;

A meu orientador, Professor Dr. Helio Langoni, pela sensibilidade e humanidade demonstrada em todos os momentos difíceis que enfrentei, e por ter confiado e acreditado incondicionalmente em mim;

A meu orientador durante os anos 2014 a 2016, Professor Dr. Germano Francisco Biondi, pelo constante incentivo e por acreditar em meu potencial;

A meu colega de Ministério da Agricultura, Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim, primeiro e grande incentivador a meu retorno ao Doutorado. Obrigado por honrar o Serviço de Inspeção Federal com transparência, honestidade e competência.

À coorientadora do meu projeto, Prof. Dra. Marianna Vaz Rodrigues. Palavras não fariam jus à importância da ajuda prestada e do conhecimento compartilhado. Com a sua gentileza, capacidade e profissionalismo, você ajudou a tornar o impossível em possível;

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biotecnologia da UNESP/Botucatu - IBTEC, na pessoa do Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior, por ceder as instalações e equipamentos onde o presente estudo foi desenvolvido;

Aos meus pais, Paulo Marino Eberhardt (*in memoriam*) e Tereza Cristina Giorno Eberhardt: vocês foram meus grandes incentivadores e me ensinaram desde cedo o valor do caráter e do trabalho. Pai: agradeço a Deus pelo inestimável tempo de vida que Ele me permitiu compartilhar com você. Mãe:

obrigado por todo o amor, paciência, dedicação e sacrifícios enfrentados para proporcionar o melhor para nossa família;

À minha esposa, Vanessa, e a meus filhos, Julia e Gustavo Vallese Eberhardt, pela alegria, companheirismo, compreensão e incentivo. Vocês me realizam como marido e pai. Amo vocês...

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração ideal para submissão de amostras para sequenciamento no equipamento ABI 3500™ (AppliedBiosystems).	25
Tabela 2 -	Valores de ciclo de amplificação (Cq) nas amostras positivas para cianobactérias amplificadas por qPCR.	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Aeromonas hydrophila</i> aderida a células epiteliais humanas. Fonte: https://microbewiki.kenyon.edu .	5
Figura 2 -	<i>Aeromonas hydrophila</i> . Coloração Gram negativa. Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Aeromonas .	5
Figura 3 -	Peixe infectado por <i>Aeromonas hydrophila</i> , apresentando ulceração superficial de pele. Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).	7
Figura 4 -	Peixe infectado por <i>Aeromonas hydrophila</i> , apresentando ulceração profunda e extensa de pele. Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).	7
Figura 5 -	Peixe infectado por <i>Aeromonas hydrophila</i> , apresentando região urogenital hiperêmica e edemaciada. Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).	7
Figura 6 -	<i>Edwardsiella tarda</i> . Mecanismo intracelular: etapa de adesão celular (A), fagocitose (B), replicação (C) e morte celular (D). Fonte: Rao et al. (2001).	8
Figura 7 -	Peixes acometidos por <i>Edwardsiella tarda</i> . Esquerda: destaque para os granulomas hepáticos e exoftalmia. Direita: órgãos edemaciados (coração e fígado). Fonte: Xu& Zhang (2014).	10
Figura 8 -	Peixe acometido por <i>Edwardsiella tarda</i> , apresentando ascite e hérnia retal. Fonte: Park et al. (2012).	10
Figura 9 -	Peixe acometido por <i>Edwardsiella tarda</i> , apresentando regiões com sufusão e área de fístula. Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).	10
Figura 10 -	Peixe apresentando úlcera de córnea, além de erosões e ulcerações crônicas e hiperpigmentadas nos flancos e na barbatana (seta), por <i>M. marinum</i> . Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).	13
Figura 11 -	Baço hipertrofiado apresentando granulomas multifocais por <i>M. marinum</i> . Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).	13
Figura 12 -	Forma cutânea de infecção por <i>Mycobacterium</i> spp, com inflamação granulomatosa da pele. Fonte: http://www.nejm.org (esquerda); https://meded.ucsd.edu (centro); https://srxawordonhealth.com (direita).	14
Figura 13 -	Floração de cianobactérias. Fonte: http://cfb.unh.edu .	15
Figura 14 -	(A) Fígado normal de uma lontra marinha. (B) Hepatomegalia, com áreas hemorrágicas. (C) Hepatócitos normais de lontra marinha. (D) Hepatócitos hipertrofiados, apresentando áreas de vacuolização citoplasmática. Fonte: Miller et al. (2010).	17

Figura 15 -	Filé de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) acondicionado em saco plástico estéril individual hermético. Fonte: arquivo pessoal.	20
Figura 16 -	Pesagem de filés de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) para extração de DNA. Fonte: arquivo pessoal.	21
Figura 17 -	Pipetagem de tampão de lise para extração de DNA com o kit Relia Prep™ gDNATissue (Promega™). Fonte: arquivo pessoal.	21
Figura 18 -	Espectrofotômetro Nanodrop (ND-1000) para quantificação das amostras extraídas. Fonte: arquivo pessoal.	22
Figura 19 -	Gel de eletroforese para visualização de produtos amplificados para <i>Mycobacterium</i> spp. 1 e 31: marcador de peso molecular de 50 pb. 2-51: amostras positivas. 52: controle positivo. 53: controle negativo (água livre de ácidos nucleicos). Fonte: arquivo pessoal.	26
Figura 20 -	Curva de amplificação para <i>cyanobacteria</i> . Observa-se que apenas algumas amostras (seta) amplificaram na reação. Fonte: arquivo pessoal.	27
Figura 21 -	Curva de dissociação para <i>cyanobacteria</i> . Observa-se que as amostras positivas (seta) amplificaram adequadamente com relação ao controle positivo. Nota-se que houve amplificação inespecífica (I). Fonte: arquivo pessoal.	27
Figura 22 -	Representação esquemática do processo básico de extração de DNA. Fonte: http://www.clontech.com/XA/Support .	67
Figura 23 -	Sequência de PCR. Fonte: http://scienceblogs.com.br/synbiobrasil/tag/pcr .	68
Figura 24 -	Esquematização da técnica de eletroforese: 1 - Gel; 2 - Aplicação do marcador; 3 - Aplicação das amostras; 4 - Indução de corrente elétrica; 5 - Deslocamento e separação dos fragmentos; 6-Eletroforese realizada. Fonte: http://www.biowiki.com.br/doku.php?id=eletroforese .	69
Figura 25 -	Esquema mostrando os diferentes sistemas de adição de fluoróforos. Fonte: http://genomictree.com/en/microarray-ngs-service .	70
Figura 26 -	Curva de amplificação, onde a linha de fluorescência está evidenciada. Fonte: Bio-Rad Laboratories. Real-Time PCR Applications Guide, 2006).	71
Figura 27 -	Curva de amplificação típica, visível devido à presença dos fluoróforos. Fonte: http://slideplayer.com.br/slide/10269606 .	71

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	5
2.2 <i>Edwardsiella tarda</i>	8
2.3 <i>Mycobacterium</i> spp.....	11
2.4 Cianobactérias.....	15
2.5 Saúde Pública.....	17
3 OBJETIVOS.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Amostragem.....	20
4.2 Extração de DNA.....	21
4.3 Testes Moleculares.....	22
4.3.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	22
4.3.2 <i>Edwardsiella tarda</i>	23
4.3.3 <i>Mycobacterium</i> spp.....	23
4.3.4 Cianobactérias.....	24
4.4 Sequenciamento.....	24
4.5 Análise Estatística.....	25
5 RESULTADOS.....	26
6 DISCUSSÃO.....	29
6.1 <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Edwardsiella tarda</i>	29
6.2 <i>Mycobacterium</i> spp.....	30
6.3 Cianobactérias.....	32
7 CONCLUSÕES.....	36
8 BIBLIOGRAFIA.....	37
9 TRABALHO CIENTÍFICO.....	61
Apêndice.....	66
Extração de DNA.....	66
Reação em Cadeia da Polimerase.....	67
PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR).....	69

EBERHARDT, B.G. **Avaliação de micro-organismos zoonóticos em filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Botucatu, 2018. 71p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Cinquenta filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) obtidos em mercado de peixes no município de Ourinhos, Estado de São Paulo, foram analisados quanto à prevalência para *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Mycobacterium* spp. e Cianobactérias. Amostras de músculo foram avaliadas por PCR para *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* e *Mycobacterium* spp., enquanto que as amostras para cianobactérias foram analisadas por PCR em Tempo Real (qPCR). Os resultados obtidos demonstraram ausência de *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda* nas amostras de filés. A prevalência para *Mycobacterium* spp. foi de 100% (50/50). Realização posterior de sequenciamento revelou *Mycobacterium gordonae*. Esta bactéria é considerada um colonizador comum, normalmente não patogênico, porém, há relatos de literatura que demonstram risco de infecção em indivíduos imunossuprimidos e até mesmo imunocompetentes. A taxa de prevalência para cianobactérias foi de 48% (24/50). As cianobactérias (algas azuis) produzem grande quantidade de metabólitos bioativos ou mesmo tóxicos, incluindo toxinas associadas a problemas ambientais e de saúde pública. Considerando a natureza e o papel das cianobactérias como patógenos emergentes, a elevada prevalência deste organismo em um alimento popular como o filé de tilápia do Nilo desperta preocupação, uma vez que os métodos tradicionais de inspeção são incapazes de detectar o patógeno, pelo fato de não provocar alterações macroscópicas nos produtos, bem como pelo potencial de toxicidade para humanos. Entretanto, estudos adicionais são necessários a fim de entender se estes compostos tóxicos estão presentes nos peixes e, caso estejam, se podem sofrer bioacumulação em níveis suficientes para afetar a saúde humana.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Mycobacterium* spp, *Mycobacterium gordonae*, cianobactéria, cianotoxina, tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, diagnóstico.

EBERHARDT, B.G. **Evaluation of zoonotic pathogens in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets**. Botucatu, 2018. 71p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Fifty fillets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a Ourinhos fish market, Sao Paulo State (Southeast Brazil) were analyzed for the prevalence of *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Mycobacterium* spp. and cyanobacteria. Muscle samples were evaluated by PCR for *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Mycobacterium* spp. Samples for cyanobacteria were analyzed by real time PCR. Both *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* were not present in fish samples. The prevalence of *Mycobacterium* spp. was 100% (50/50). Sequencing revealed *Mycobacterium gordonae*. This agent is usually a ubiquitous and commonly nonpathogenic colonizing organism, although many research publications have reported disease in immunocompromised or even in immunocompetent patients. Prevalence for cyanobacteria was 48% (24/50). Cyanobacteria (blue-green algae) produce a diversity of toxic or otherwise bioactive metabolites, including a number of toxins that have been associated with human and environmental health concerns. Considering the nature and role of cyanobacteria as a pathogen of emerging importance, the high prevalence of this organism in a popular food item such as Nile tilapia raises concern, since no macroscopic alterations can be detected through regular food inspection methods. However, further studies are necessary in order to understand whether these compounds are present in fish and, if so, if they could accumulate sufficiently to affect human health.

Key words: *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Mycobacterium* spp, *Mycobacterium gordonae*, Cyanobacteria, cyanotoxins, Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

Segundo relatório da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2014), a carne de peixes desempenha papel de suma importância na alimentação mundial, cujo consumo *per capita* subiu de 9,9 kg na década de 60, para 19,2 kg em 2012, correspondendo a cerca de 17% de toda a proteína consumida no mundo. Além de sua importância nutricional, estima-se que a atividade pesqueira empregue cerca de 60 milhões de pessoas, sendo o sustento de 10 a 12% de toda a população mundial.

No que concerne à produção pesqueira na América do Sul, de acordo com o último Boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura, elaborado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2011), o Brasil ocupa o 3º lugar, atrás de Peru e Chile, com aproximadamente 1,3 milhão de toneladas produzidas, o que representa um incremento de aproximadamente 13,2% em relação a 2010.

Frente a um cenário mundial de crescimento populacional acelerado, onde espera-se que o planeta alcance a marca de 9,6 bilhões de pessoas em 2050, surgem dois enormes desafios: fornecer alimento seguro para a população mundial e, ao mesmo tempo, garantir que as reservas naturais estejam protegidas para as futuras gerações. Levando-se em consideração a necessidade dos humanos por uma dieta balanceada, o pescado torna-se uma das principais opções disponíveis, devido ao seu excelente valor nutritivo, com altos teores de vitaminas A e D, cálcio, ômega-3 e fósforo, baixa quantidade de lipídios, os quais apresentam alta qualidade, além da presença de proteínas de elevado valor biológico (HUNTER e ROBERTS, 2000).

Dentre as espécies de peixe mais consumidas no Brasil, destaca-se a espécie *Oreochromis niloticus*, popularmente conhecida como “tilápia do Nilo”. Segundo dados do IBGE (2016), a produção de tilápia no Brasil aumentou 9,7% em 2015 e chegou a 219 mil toneladas entre janeiro e dezembro, sendo a espécie predominante na piscicultura no país, representando 45,4% da produção total.

O pescado pode ser contaminado com o mais amplo e variado grupo de micro-organismos, bem como por resíduos de produtos químicos, a partir de águas contaminadas ou poluídas dos estuários e das bacias pesqueiras. Dentre os micro-organismos de risco, destacam-se os agentes bacterianos, os quais, notadamente, podem desempenhar importante papel zoonótico. De acordo com Haenen et al. (2012), as infecções zoonóticas transmitidas por peixes podem ocorrer de duas maneiras:

- 1) Topicamente, pelo contato direto com os animais aquáticos ou com seus produtos;

2) Infecções alimentares, causadas pela ingestão de produtos aquáticos crus ou mal cozidos contaminados.

Dentre as bactérias responsáveis pela transmissão de zoonoses, *Aeromonas hydrophila* (DASKALOV, 2006), *Edwardsiella tarda* (GRIFFIN et al., 2013) e *Mycobacterium* spp. (HAENEN et al., 2012) têm sido implicadas em perdas significativas em instalações de aquicultura em todo o mundo, bem como em surtos alimentares após ingestão de carne de peixe crua, consideradas doenças de risco para a saúde pública, associadas com a aquicultura (LEHANE e RAWLIN, 2000).

Igualmente, as cianobactérias, também conhecidas como algas azuis, produzem grande variedade de metabólitos tóxicos ou bioativos, os quais têm sido associados a problemas ambientais e de saúde em humanos (FUNARI e TESTAI, 2008). Destes, talvez os mais estudados sejam as microcistinas. Vários estudos têm sugerido que as microcistinas, assim como outras toxinas de algas, podem se acumular em peixes e outros animais aquáticos para alimentação humana, estando associadas a lesão hepática em mamíferos (MAGALHÃES et al., 2003; XIE et al., 2005; WILSON et al., 2006; IBELINGS e CHORUS, 2007).

As zoonoses transmitidas pelos peixes têm recebido crescente atenção à medida que métodos microbiológicos e moleculares mais eficientes têm possibilitado a identificação de novos patógenos bacterianos em hospedeiros humanos (GAUTHIER, 2015). Nesse contexto, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de extrema importância para a detecção e compreensão da patogenia destes microorganismos implicados em doenças de alto impacto em aquicultura, assim como em quadros zoonóticos. Conjuntamente à PCR, a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE – HPLC, na sigla em inglês), é atualmente o método mais utilizado para a identificação e quantificação de cianotoxinas, o qual, além de apresentar sensibilidade e especificidade, possibilita a identificação e quantificação individual de microcistinas (HARADA et al., 1999). Desta forma, quando utilizada, possibilita não somente identificar a presença da microcistina nos tecidos animais, mas também quantificá-la, auxiliando no estudo e compreensão das cianobactérias, o que a torna valiosa em Saúde Pública.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Aeromonas hydrophila*

Atualmente, são conhecidas 24 espécies do gênero *Aeromonas* spp. (JANDA e ABBOTT, 2010). *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) é um bacilo gram-negativo (Figuras 1 e 2), mesófilo, pertencente à família *Aeromonadaceae*, não formador de esporo e anaeróbico facultativo (IGBINOSA et al., 2012; ALI et al., 2014; KORKOCA et al., 2014), considerado patógeno aquático emergente, amplamente distribuído no meio ambiente (DASKALOV, 2006) e representa um problema preocupante para a Saúde Pública e para a saúde animal, devido à alta patogenicidade (EDBERG et al., 2007). Este patógeno tem sido descrito como causador de doenças em várias espécies de sangue frio (peixes, répteis e anfíbios), bem como em mamíferos e aves (SWANN e WHITE, 1991; GOSLING, 1996; AUSTIN e ADAMS, 1996), capaz de ser transmitida de animais para humanos, e vice-versa (LEHANE e RAWLIN, 2000; DASKALOV, 2006; HAENEN et al., 2012), caracterizado, portanto, como zoonose.

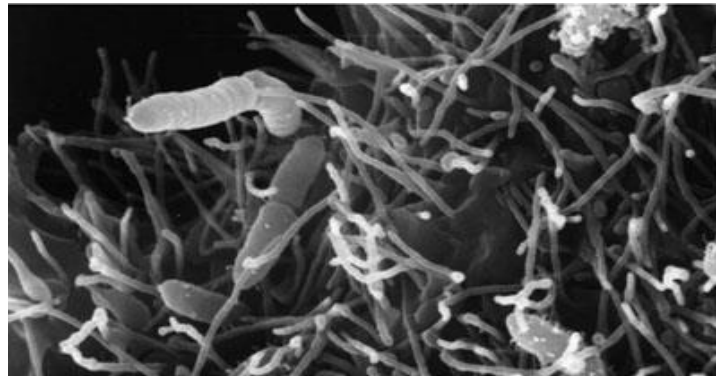


FIGURA 1. *Aeromonas hydrophila* aderida a células epiteliais humanas. Fonte: <https://microbewiki.kenyon.edu>

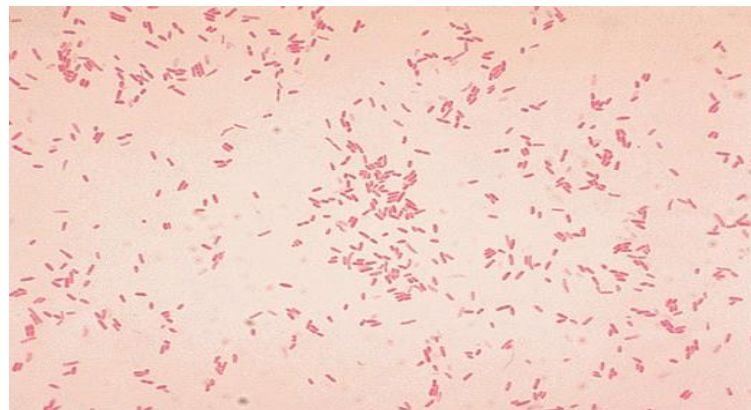


FIGURA 2. *Aeromonas hydrophila*. Coloração Gram negativa. Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Aeromonas>

Segundo Palumbo (1996), *A. hydrophila* tem sido isolada de uma ampla gama de produtos animais e vegetais, incluindo carne vermelha crua, carne de aves, peixes, frutos do mar, produtos lácteos, vegetais e alimentos mistos.

Bactérias do gênero *Aeromonas* são capazes de sobreviver e multiplicar em baixas temperaturas em grande variedade de produtos alimentícios estocados entre 2 e 10°C, tal como carne bovina crua, carne assada e carne suína (KROVACEK et al., 1992; MANO et al., 2000) e podem produzir fatores de virulência mesmo em tais condições (MATEOS et al., 1993; MERINO et al., 1995).

Parker e Shaw (2010) observaram que *Aeromonas* spp. possuem fatores de virulência, tais como hemolisinas, aerolisinas, proteases, adesinas, enterotoxinas, lipases e fosfolipases. Infecções causadas por *Aeromonas* spp. podem levar a quadros de gastroenterite, septicemia, meningite, síndrome respiratória e síndrome hemolítico urêmica.

A presença de *Aeromonas* spp. tem sido relatada em produtos lácteos (4%), vegetais (26-41%), carne vermelha e carne de frango (3-70%), embora a maior frequência de amostras positivas tenha sido isolada de frutos do mar (31-72%) (JANDA e ABBOTT, 2010). A identificação de *Aeromonas* spp. de origem alimentar mostra predominância de *A. hydrophila* (YUCEL e CITAK, 2003; HERRERA et al., 2006; SALAH EL-DIEN e SAMI, 2009; ERDEM et al., 2010; XANTHOPOULOS et al., 2010; SHARMA e KUMAR, 2011; OSMAN et al., 2012). Embora *A. hydrophila* seja a espécie mais comumente relatada como tendo potencial zoonótico, pode haver relatos por *A. sobria* e *A. caviae* (KHARDORI e FAINSTEIN, 1988; VARTIAN e SEPTIMUS, 1990; NOGA, 2010).

A. hydrophila está presente em todos os tipos de ambientes aquáticos, tendo sido isolada a partir de água potável e alimentos, o que a torna sério problema em termos de Saúde Pública e saúde animal (EDBERG et al., 2007). Este agente bacteriano acomete diversas espécies de peixes de água doce no mundo todo (AUSTIN & ADAMS, 1996), causando surtos em fazendas pesqueiras com altas taxas de mortalidade e perdas econômicas elevadas para a indústria de aquicultura (FANG et al., 2004).

Em geral, são necessários fatores de estresse ambiental ou coinfeção com outro agente para que ocorra infecção de peixes por *A. hydrophila*. As lesões são consistentes com sepsis, incluindo petéquias na pele e barbatanas, ulcerações e eritema da pele, anorexia, exoftalmia e ascite (Figuras 3, 4, 5) (AGNEW e BARNES, 2007; NOGA, 2010). Reservatórios de água contendo altos níveis de nutrientes podem propiciar o aumento de *Aeromonas* spp., o que pode representar risco de infecção para humanos, por meio de feridas ou da ingestão.



FIGURA 3. Peixe infectado por *Aeromonas hydrophila*, apresentando ulceração superficial de pele. Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).



FIGURA 4. Peixe infectado por *Aeromonas hydrophila*, apresentando ulceração profunda e extensa de pele. Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).



FIGURA 5. Peixe infectado por *Aeromonas hydrophila*, apresentando região urogenital hiperêmica e edemaciada. Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).

O papel potencial de *A. hydrophila* em infecções gastrintestinais em humanos foi citado por Kirov (2003), segundo o qual, a maior parte dos casos de gastroenterite (> 85%) são atribuídos a três espécies de *Aeromonas* spp., incluindo, *A. hydrophila*.

A. hydrophila se destaca como importante patógeno alimentar, implicada em diversos episódios, os quais vão desde quadros de diarreia aguda (POGORELOVA et al., 1995), septicemia fatal (SHIINA et al., 2004), agente complicador em pacientes apresentando cirrose hepática (QU et al., 2003), infecção ocular em pacientes

imunocomprometidos, pneumonia fatal em uma criança de 5 anos (KAO et al., 2003) e, mais raramente, fascíte necrosante, a qual pode acometer pacientes imunodeprimidos, apresentando queimaduras ou que tenham sofrido trauma físico em ambientes aquáticos onde a bactéria se faz presente (MINNAGANTI et al., 2000).

2.2 *Edwardsiella tarda*

Edwardsiella tarda (*E. tarda*) é um bacilo gram-negativo intracelular facultativo (Figura 6), anaeróbio facultativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que mede cerca de 2-3 μm de comprimento e 1 μm de diâmetro (WOO e BRUNO, 2010). Esta bactéria está envolvida diretamente em quadros de doenças em muitas espécies de peixes de importância econômica em todo o mundo, desde 1962 (HOSHINA, 1962; MOHANTY e SAHOO, 2007), bem como em quadros zoonóticos (LEHANE e RAWLIN, 2000).

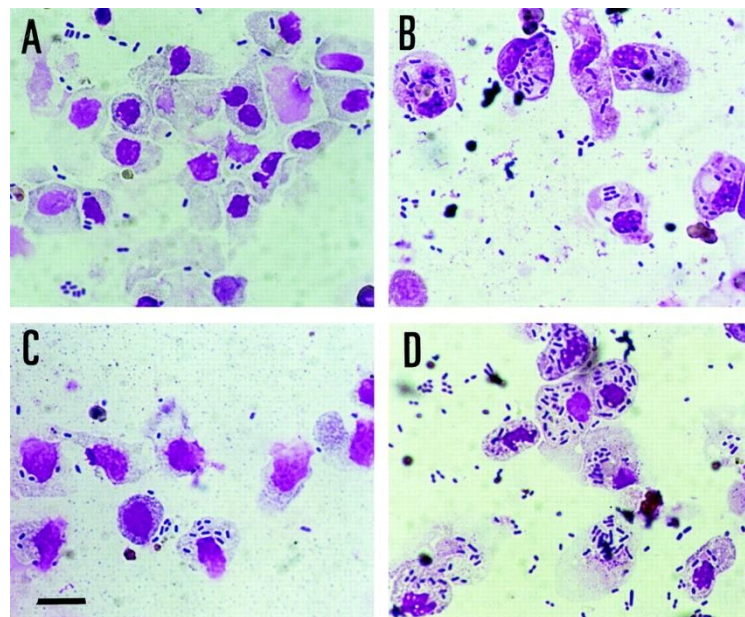


FIGURA 6. *Edwardsiella tarda*. Mecanismo intracelular: etapa de adesão celular (A), fagocitose (B), replicação (C) e morte celular (D). Fonte: Rao et al. (2001).

Os membros do gênero *Edwardsiella* estão principalmente associados a ambientes aquáticos e a animais que habitam tais ecossistemas, como anfíbios, répteis e peixes (JANDA e ABBOTT, 1993).

O gênero *Edwardsiella* é composto por três espécies: *E. tarda*, *E. ictaluri* e *E. hoshinae* (EWING et al., 1965; GRIMONT et al., 1980; HAWKE et al., 1981). Os peixes são predominantemente infectados por *E. tarda* ou *E. ictaluri*, enquanto que infecção por *E. hoshinae* é mais comum em répteis e aves (WOO e BRUNO, 2010).

E. tarda foi originalmente isolada de cultivo de enguias japonesas (*Anguilla japonica*) no Japão, em 1962 (HOSHINA, 1962). Achados subsequentes foram relatados em cobras no Japão (SAKAZAKI, 1965) e em fezes humanas nos Estados Unidos (EWING et al., 1965). É o membro mais difundido do gênero *Edwardsiella*, tendo sido relatada em mais de 20 espécies de peixes marinhos e de água doce, em 25 países das Américas, Europa, Ásia, Austrália, África e Oriente Médio (HAWKE e KHOO, 2004).

Além de estar presente em uma ampla gama de peixes marinhos e de água doce, o isolamento de *E. tarda* também foi relatado em invertebrados e anfíbios (WYATT, 1979), répteis (SAKAZAKI, 1965; IVESON, 1971), aves (WHITE et al., 1973; VAN DAMME e VANDEPITTE, 1984; LEOTTA et al., 2009) e mamíferos, inclusive humanos, bovinos, suínos, cães e focas de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) (EWING et al., 1965; ARAMBULO et al., 1968; TACAL e MENEZ, 1969; VAN DAMME e VANDEPITTE, 1984; MIZUNOE et al., 2006; LEOTTA et al., 2009). Esses relatos indicaram que *E. tarda* possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo até mesmo na Antártida (LEOTTA et al., 2009), o que o torna patógeno importante em Saúde Pública, uma vez que atua como bactéria epizootica e também zoonótica (WOO e BRUNO, 2010).

Edwardsielose em peixes ocorre usualmente em condições de desequilíbrio ambiental, tal como alta temperatura, baixa qualidade da água e alto conteúdo orgânico (WOO e BRUNO, 2010). Os peixes infectados com *E. tarda* mostram comportamento natatório anormal, incluindo movimento em espiral e flutuação próximo à superfície da água (MEYER e BULLOCK, 1973; MIYAZAKE e KAIGE, 1985).

Embora os sinais clínicos variem após o início da infecção, os peixes infectados com *E. tarda* apresentam perda de pigmentação, hérnia retal, exoftalmia (Figura 7), opacidade ocular, aumento de volume na região abdominal (Figura 8) e hemorragia petequiral (Figura 9) nas barbatanas e na pele (EGUSA, 1976; SAHOO, 1998; MIYAZAKE e KAIGE, 1985). À laparotomia, verifica-se ascite aquosa e sanguinolenta na cavidade celomática, congestão hepática, renal e esplênica (MIYAZAKE e EGUSA, 1976; MIYAZAKE e KAIGE, 1985).

Dentre as características histopatológicas da edwardsielose em peixes estão a nefrite intersticial supurativa, hepatite supurativa e inflamação purulenta do baço (EGUSA, 1976; MIYAZAKE e EGUSA, 1976; MIYAZAKE e EGUSA, 1976b; MIYAZAKE e KAIGE, 1985). Abscessos de vários tamanhos, colonização bacteriana e infiltrados de neutrófilos e macrófagos são encontrados no fígado, baço e rins (EGUSA, 1976; MIYAZAKE e EGUSA, 1976; MIYAZAKE e EGUSA, 1976b).

Outras características patológicas em peixes também têm sido relatadas, tal como hemorragia petequiral dorsolateral e abscessos em lesões cutâneas em bagres americanos

(*Ictalurus punctatus*) (MEYER e BULLOCK, 1973; DARWISH et al., 2000); hiperplasia, necrose e inflamação das linhas laterais em robalo riscado (*Morone saxatilis*) (HERMAN e BULLOCK, 1986).

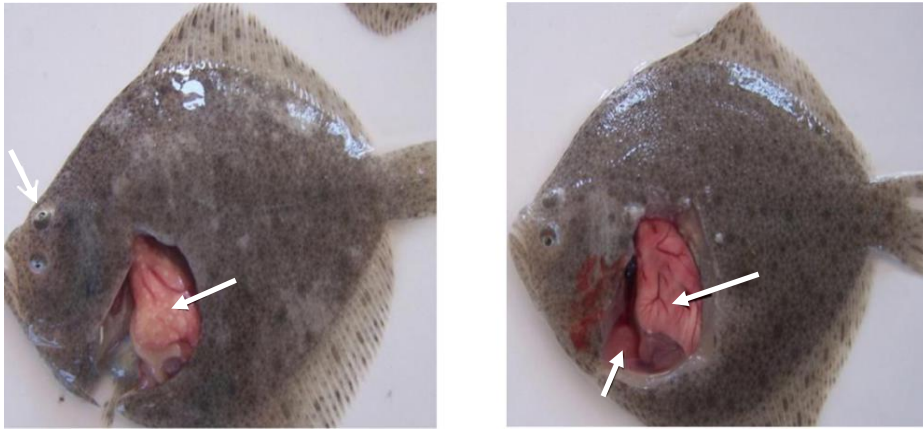


FIGURA 7. Peixes acometidos por *Edwardsiella tarda*. Esquerda: destaque para os granulomas hepáticos e exoftalmia. Direita: órgãos edemaciados (coração e fígado). Fonte: Xu & Zhang (2014).



FIGURA 8. Peixe acometido por *Edwardsiella tarda*, apresentando ascite e hérnia retal. Fonte: Park et al. (2012).

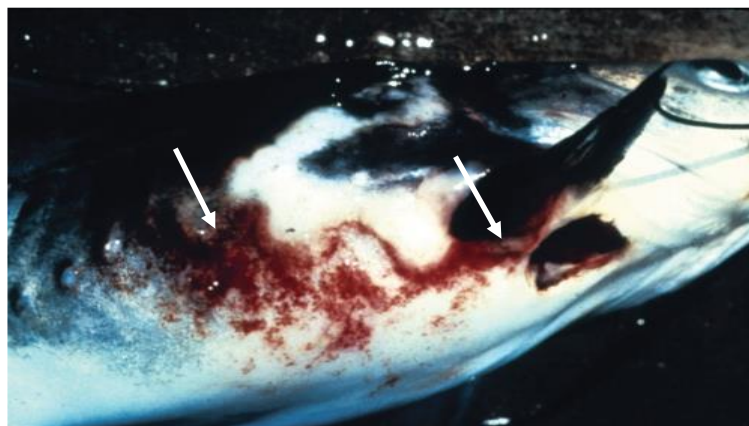


FIGURA 9. Peixe acometido por *Edwardsiella tarda*, apresentando regiões com sufusão e área de fístula. Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).

E. tarda tem sido considerado patógeno não usual em humanos, o qual está primariamente associado com gastroenterite, infecções em lesões tais como celulite ou gangrena gasosa e infecções generalizadas em humanos apresentando imunossupressão (THUNE et al., 1993; PLUMB, 1999; SRINIVASA RAO et al., 2001; NUCCI et al., 2002).

Pacientes infectados por *E. tarda* apresentam frequentemente gastroenterite com diarreia aquosa, predominantemente em pacientes imunocomprometidos, idosos e crianças (SLAVEN et al., 2001; WANG et al., 2005; SPENCER et al., 2008). A doença intestinal causada por *E. tarda* é caracterizada por diarreia com aspecto que varia de aquoso até sanguinolento, de curso prolongado ou intermitente. Anorexia e vômito são comuns em neonatos e crianças, as quais são particularmente susceptíveis à infecção devido à imaturidade do sistema imune (LIM, 1978; VANDEPITTE et al., 1983). Em alguns casos, foram relatadas gastroenterites que progrediram até se tornar colite ulcerativa (ENGEL e MARTIN, 2006), e pacientes que recebem terapia imunossupressiva durante transplante de órgãos são susceptíveis ao desenvolvimento de gastroenterite por *E. tarda* (SPENCER et al., 2008). A preocupação com a doença é grande em regiões tropicais e subtropicais, em que hábitos alimentares como consumo de pescado e frutos do mar crus estão diretamente associados a manifestações clínicas da doença (TSUJI et al., 2008).

As manifestações extraintestinais da infecção incluem infecção do trato biliar, bacteremia, infecção da pele e dos tecidos moles, abscesso hepático, peritonite, abscesso intra-abdominal, e abscesso tubo-ovariano (WANG et al., 2005). O patógeno também tem sido relatado como causador de mionecrose, infecção intrauterina puerperal, artrite séptica e empiema (ASHFORD et al., 1998; SLAVEN et al., 2001; MIKAMO et al., 2003; MIZUNOE et al., 2006). Muitas doenças sistêmicas tais como septicemia, meningite, colecistite, endocardite, abscesso hepático e osteomielite, também foram relatadas (CLARRIDGE et al., 1980; JANDA e ABBOTT, 1993). Estas observações suscitaram preocupação acerca do papel de *E. tarda* como bactéria zoonótica.

2.3 *Mycobacterium* spp.

As bactérias do gênero *Mycobacterium* são pleomórficas, aeróbicas, álcool-ácido resistentes (BAAR), pertencentes à família *Mycobacteriaceae*, com cerca de 0.2-0.6 µm de diâmetro e 1-10 µm de comprimento. Atualmente, 186 espécies e 13 subespécies de *Mycobacterium* são reconhecidas na Lista de Nomes Procarióticos com Nomenclatura Reconhecida (*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* - LPSN, 2017). As bactérias desse gênero diferem imensamente em sua ecologia, variando do importantíssimo patógeno *M. tuberculosis*, uma das principais causas de morte em todo o

mundo, a residentes saprófitas do solo, como *Mycobacterium terrae* (GAUTHIER e RHODES, 2009).

Mycobacterium spp. estão frequentemente envolvidas em quadros patogênicos em peixes marinhos e de água doce. *M. marinum* está amplamente distribuído pelo mundo, relacionado com doenças de pele em humanos (DOBOS et al., 1999; DECOSTERE et al., 2004).

As chamadas micobactérias não-tuberculosas (MNT) estão presentes em todos os tipos de ambientes naturais como solo, água e aerossóis e também estão presentes nos sistemas de distribuição de água potável em todo o mundo como residentes persistentes da microbiota (FALKINHAM, 1996). Em anos recentes, estes agentes têm recebido atenção crescente como agentes causadores de infecções oportunistas em humanos (VAN INGEN, 2015). Elas podem afetar grande variedade de animais, inclusive peilotérmicos; várias espécies de micobactérias causam doenças em peixes, répteis e anfíbios (KAATTARI et al., 2006), das quais três espécies estão mais comumente associadas com doenças em peixes: *M. marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* (TALAAT et al., 1999; ASTROFSKY et al., 2000; BERAN et al., 2006; GAUTHIER e RHODES, 2009).

Em anos recentes, grande número de espécies de *Mycobacterium* têm sido isoladas a partir de peixes, suplantando o paradigma de que *M. marinum*, *M. fortuitum*, e *M. chelonae* são os únicos agentes causadores de micobacterioses em peixes (GAUTHIER e RHODES, 2009).

Neste contexto, várias espécies têm sido associadas a micobacterioses em peixes, incluindo *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. neoaurum*, *M. shottsii*, *M. pseudoshottsii*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae* entre outras, mostrando que as micobacterioses estão entre as doenças mais comuns em criações de peixes comerciais e em peixes selvagens em todo o mundo (BERAN et al., 2006; GAUTHIER e RHODES, 2009; MRLIK et al., 2012).

Estudo de revisão publicado em 1963 apontou 151 espécies de peixes afetadas por micobacterias (NIGRELLI e VOGEL, 1963). Desde então, essa lista tem aumentado consideravelmente, sendo que as infecções micobacterianas têm sido descritas em peixes marinhos e de água doce, de latitudes tropicais até subárticas (LUND e ABERNETHY, 1978; ARAKAWA e FRYER, 1984; MACKENZIE, 1988; DAOUST et al., 1989; NOGA et al., 1990; LANSDELL et al., 1993; BRUNO et al., 1998; DIAMANT et al., 2000; RHODES et al., 2004).

A micobacteriose em peixes se apresenta predominantemente na forma crônica, podendo não apresentar sinais clínicos. Todos os tecidos do animal podem estar envolvidos, incluindo olhos, brânquias, vísceras, musculatura e barbatanas. Os sinais

clínicos externos não são específicos e incluem perda de escamas e úlceras da derme, alterações pigmentares, comportamento anormal, defeitos na espinha, perda de peso excessiva e ascite (Figura 10) (NIGRELLI e VOGEL, 1963; ROSS, 1970; SNIESZKO, 1978; WOLKE e STROUD, 1978; BRUNO et al., 1998).



FIGURA 10. Peixe apresentando úlcera de córnea, além de erosões e ulcerações crônicas e hiperpigmentadas nos flancos e na barbatana (seta), por *M. marinum*. Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).

Os sinais internos de infecção incluem aumento de tamanho do baço (Figura 11), rins e fígado, bem como nódulos brancos ou acinzentados característicos em órgãos internos (CHINABUT, 1999). Doença aguda é ocasionalmente observada em associação com cargas bacterianas elevadas (WOLF e SMITH, 1999; WHIPPS et al., 2007). A micobacteriose não está tipicamente associada a mortalidade em alta escala em peixes selvagens, embora perdas significativas atribuídas a essa doença tenham ocorrido em aquicultura (HEDRICK et al., 1987; BRUNO et al., 1998).

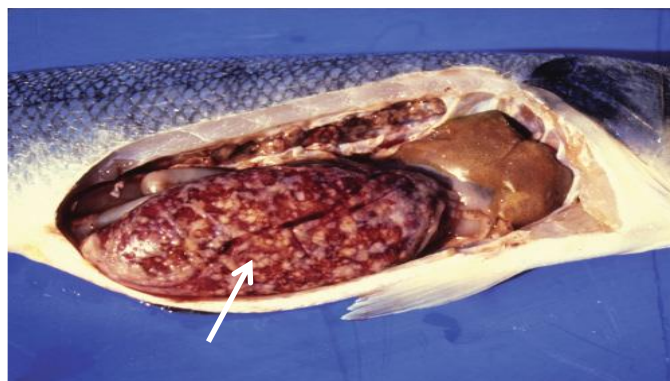


FIGURA 11. Baço hipertrofiado apresentando granulomas multifocais por *M. marinum*. Fonte: Noga, E.J. Fish Disease – 2ª Edição (2010).

A água pode ser considerada como via de transmissão de *M. marinum* para os humanos, por contaminações via aquários e atividades na indústria pesqueira (FALKINHAM III, 1996).

Em infecções humanas, *M. marinum* ganha acesso por lesões prévias de pele e, geralmente, se caracterizam por lesões superficiais envolvendo as mãos, antebraços, cotovelos e joelhos (EVEN-PAZ et al., 1976; HUMINER et al., 1986; STEITZ et al., 1997).

A ocorrência de micobacterioses em humanos geralmente está associada com alguma atividade aquática, como natação, pesca, navegação ou aquarismo (COLLINS et al., 1985). Várias outras formas de transmissão são descritas, a saber, manuseio de aquários ou tanques com peixes contaminados, mordidas de golfinho em cativeiro, ferimentos provocados por nadadeiras de peixes ou manuseio de motor de barco e outras (COLLINS et al., 1985; BRAGG et al., 1990).

M. fortuitum também pode provocar lesões em humanos, havendo relatos de doenças pulmonares causadas por esse agente (NIGRELLI e VOGEL, 1963). O isolamento desta micobactéria em várias espécies de peixes ornamentais na África do Sul é um dado importante, a partir da possibilidade de infecções em humanos pelo manuseio de aquários contaminados (BRAGG et al., 1990).

Contaminação humana por bactérias deste gênero podem se manifestar de forma cutânea, com conseqüente inflamação granulomatosa da pele (Figura 12), podendo também acometer tecidos mais profundos, resultando em bursites, artrites e tendinites (LAHEY, 2003).



FIGURA 12. Forma cutânea de infecção por *Mycobacterium* spp, com inflamação granulomatosa da pele. Fonte: <http://www.nejm.org> (esquerda); <https://meded.ucsd.edu> (centro); <https://srxawordonhealth.com> (direita).

M. gordonae é uma micobactéria não-tuberculosa ou oportunista, presente em todos os ambientes, caracterizando-se como a terceira micobactéria mais frequentemente encontrada, superada somente por *Mycobacterium tuberculosis* e o complexo *Mycobacterium avium* (WOODS e WASHINGTON, 1987). No entanto,

surpreendentemente, essa bactéria é responsável por poucas infecções, considerada de baixo potencial patogênico (WOODS e WASHINGTON, 1987).

M. gordonae é comumente encontrado na água e quando recuperado em cultura, é considerado de menor significado clínico ou, mesmo, um contaminante (ECKBURG et al., 2000). Relatos de infecções estão geralmente associados a pacientes imunocomprometidos, causando infecções nos pulmões, tecidos moles, córnea e cavidade peritoneal (CHAN et al., 1984; CARCABA et al., 1989; BARBE et al., 1991; GARCIA-FORCADA et al., 1991; WEINBERGER et al., 1992). Menos frequentemente, *M. gordonae* pode causar doença disseminada e bacteremia (CHAN et al., 1984; BERBARD et al., 1992; BONNET et al., 1996).

2.4 Cianobactérias

A deterioração ou a alteração dos parâmetros físico-químicos da água predispõe o crescimento acelerado de plantas superiores e de microalgas, também conhecidas como cianofíceas, algas azuis ou cianobactérias (GOWEN, 1994), muitas das quais são utilizadas como fonte de alimento por várias espécies de peixes (MOHAMED e HUSSEIN, 2006). Além de alterar a biodiversidade aquática e as qualidades cênicas locais, a rápida proliferação das algas, fenômeno conhecido como floração, predispõe a morte de organismos aquáticos devido ao decréscimo nos níveis de oxigênio dissolvido e à liberação de substâncias tóxicas denominadas cianotoxinas (BEASLEY et al., 1989; MOHAMED e HUSSEIN, 2006).



FIGURA 13. Floração de cianobactérias. Fonte: <http://cfb.unh.edu>.

Dentre tais toxinas, destacam-se as microcistinas, uma família de toxinas estruturalmente semelhantes, as quais têm como alvo o fígado, visto que a citotoxicidade é mais acentuada nos hepatócitos do que em outros tipos celulares (MCDERMOTT et al., 1998; ZHAN et al., 2004).

São relatadas atualmente mais de 80 análogos de microcistinas, todos contendo um anel cíclico de sete aminoácidos e dois aminoácidos variáveis, indicados por duas letras após a respectiva microcistina, como LR, YR e RR, onde L é Leucina, R é arginina e Y é tirosina (CARMICHAEL et al., 1988).

Estudos demonstraram que as microcistinas são potentes inibidores das fosfatases 1 e 2A (YOSHIZAWA et al., 1990; ERIKSSON et al., 1990). A interação entre microcistinas e as fosfatases ocorre por meio de pontes de hidrogênio, interação hidrofóbica e ligação covalente. A formação de ligação covalente causa hiperfosforilação, levando à ruptura da rede citoesquelética dos hepatócitos, resultando em insuficiência e hemorragia hepáticas (HONKANEN et al., 1990; MACKINTOSH et al., 1990). As microcistinas também podem aumentar o estresse oxidativo, desencadear a apoptose e promover a formação tumoral (LANKOFF et al., 2004).

A ingestão de microcistina em baixas concentrações e por longo período pode predispor ao desenvolvimento de carcinoma hepático, como observado na China, onde a ingestão de água contaminada pela microcistina foi relacionada a incidência oito vezes maior de câncer hepático primário (YU, 1989).

A toxicidade aguda por microcistina é uma ameaça tanto para a saúde animal quanto humana (YU, 1989; LAWTON e CODD, 1991; CARMICHAEL, 1994). A Organização Mundial de Saúde estabeleceu o limite diário tolerável de ingestão para exposição crônica à microcistina-LR de 0,04 µg/kg/dia de peso corporal, e 1 mg/L (1 nM) como sendo o limite de segurança em águas destinadas ao consumo humano (TOXINS, 2003). Trata-se do análogo mais comum e também o mais tóxico presente em água potável.

Em mamíferos, a toxicidade das microcistinas pode ser exacerbada quando estes consomem as algas presentes em águas contaminadas, resultando em liberação de microcistina adicional devido à lise de células de cianobactérias pela digestão (Figura 14). A presença de toxinas de algas é um perigo para várias espécies aquáticas (LANDSBERG, 2002; PAVAGADHI e BALASUBRAMANIAN, 2013) e uma preocupação mundial em termos de Saúde Pública em todo o mundo (POSTE et al., 2011).

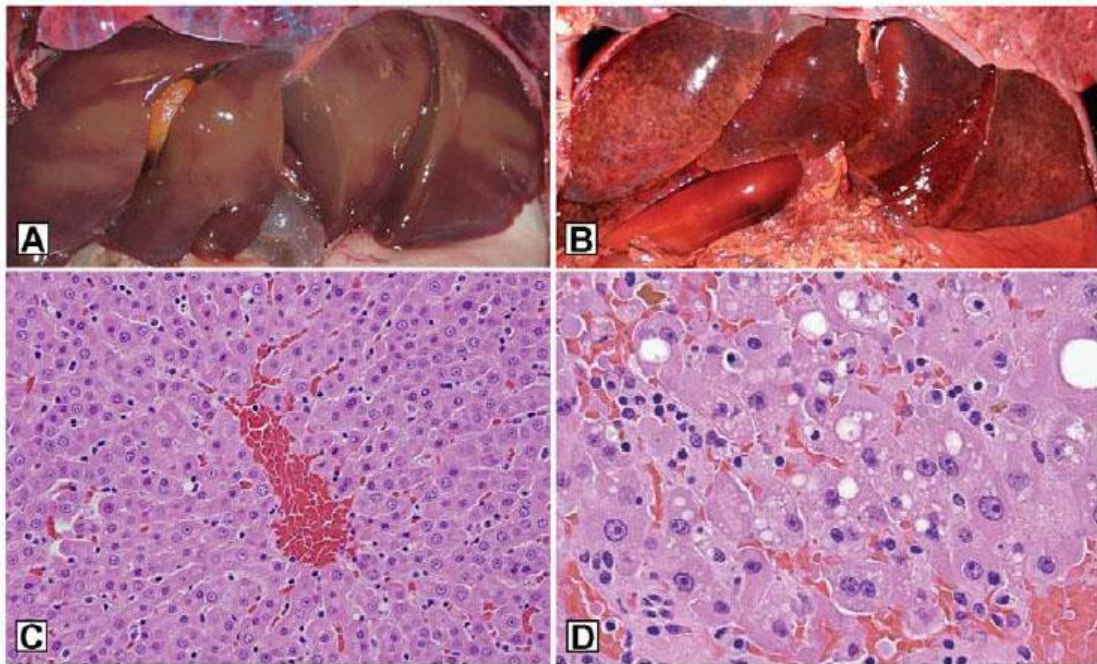


FIGURA 14. (A) Fígado normal de uma lontra marinha. (B) Hepatomegalia, com áreas hemorrágicas. (C) Hepatócitos normais de lontra marinha. (D) Hepatócitos hipertrofiados, apresentando áreas de vacuolização citoplasmática. Fonte: Miller et al. (2010).

Pesquisas têm demonstrado o perigo da bioacumulação de microcistina em invertebrados e vertebrados aquáticos, incluindo os peixes, que participam da cadeia alimentar humana (MAGALHÃES et al., 2003; XIE et al., 2007).

Mohamed et al. (2003) relataram o acúmulo de microcistina no intestino, no fígado e no rim de tilápias (*O. niloticus*). Em ensaio experimental, Soares et al. (2004) também relataram bioacumulação de microcistina-LR no músculo e em maior concentração no fígado de peixes (*T. rendalli*), uma vez que este é o órgão alvo da toxina.

É importante notar que nem o ato de ferver a água nem cozinhar o peixe antes do consumo são eficazes em diminuir o risco de exposição à microcistina (HARADA et al., 1996; ZHANG et al., 2010).

Poste et al. (2011) verificaram que a microcistina está presente na água e nos peixes de vários lagos de clima tropical e temperado, incluindo alguns dos lagos com maior atividade pesqueira do mundo, demonstrando que o consumo de pescado pode ser uma das principais vias de exposição à microcistina para os humanos, levando os consumidores a exceder as concentrações diárias recomendadas para a microcistina.

2.5 Saúde Pública

À medida que a aquicultura se populariza e, ainda, em vista da emergente resistência dos agentes bacterianos aquáticos aos antimicrobianos convencionais, as

bactérias passam a apresentar sérias implicações em Saúde Pública (LEHANE e RAWLIN, 2000; CABELLO, 2006). Outro ponto relevante é que esses micro-organismos, embora patogênicos para o homem, não apresentam nenhuma alteração macroscópica nos filés, o que aumenta o risco de infecção nos consumidores. O maior agravante é a mudança do hábito alimentar, ou seja, o consumidor brasileiro ingere pescado na forma crua devido à característica da preservação dos nutrientes e frescor, o que pode acarretar em infecção por patógenos que estejam presentes nos filés de tilápia.

3. OBJETIVOS

- Detectar a presença de *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Mycobacterium* spp. e cianobactérias em filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com auxílio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Considerando o caráter endêmico e/ou desconhecido da maioria das doenças de animais aquáticos no Brasil, a prevalência utilizada foi de 10%, de forma discricionária, para todos os agentes pesquisados, conforme preconizado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2013).

Para o cálculo da amostragem foi utilizada a ferramenta “EpiTools” (*freeware*) da empresa “AusVet Animal Health Services”, na qual é possível determinar o tamanho da amostragem para identificação da presença de doenças utilizando amostras em pool (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=PPFreedom>). Para tal, foi selecionado o estudo de proporção com intervalo de confiança de 95%. Com esses dados, para se ter confiabilidade nos resultados, seriam necessárias pelo menos 32 amostras, porém como a prevalência varia de acordo com o patógeno, foram coletadas 50 amostras para se ter uma margem de segurança maior.

A origem da matéria prima adquirida no varejo não possuía informações (rotulagem) que permitissem caracterizar de forma precisa sua origem. Assim, foram coletados 50 filés congelados de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), em coleta única, na forma de amostragem por conveniência, comercializados em supermercado no município de Ourinhos, SP. Após a colheita, os filés foram acondicionados e identificados em sacos plásticos estéreis individuais herméticos (Figura 15). Em seguida, o material foi colocado em um isopor com gelo em escama para preservar a temperatura durante o transporte até o laboratório para a análise.



FIGURA 15. Filé de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) acondicionado em saco plástico estéril individual hermético. Fonte: arquivo pessoal.

4.2 Extração de DNA

As análises moleculares foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Biotecnologia, UNESP, Botucatu. Para a extração de DNA foram pesados 20 mg da musculatura de cada filé (Figura 16). Em seguida, as amostras foram submetidas à extração com o kit Relia Prep™ gDNA Tissue (Promega™), de acordo com as recomendações do fabricante (Disponível em: <https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/reliaprep-gdna-tissue-miniprep-system-protocol.pdf>). Após esse procedimento, as amostras foram quantificadas e avaliadas quanto à sua pureza no espectrofotômetro Nanodrop 2000™ (Figura 18). O DNA extraído foi mantido a -20°C até a realização dos testes moleculares.



FIGURA 16. Pesagem de filés de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) para extração de DNA. Fonte: arquivo pessoal.

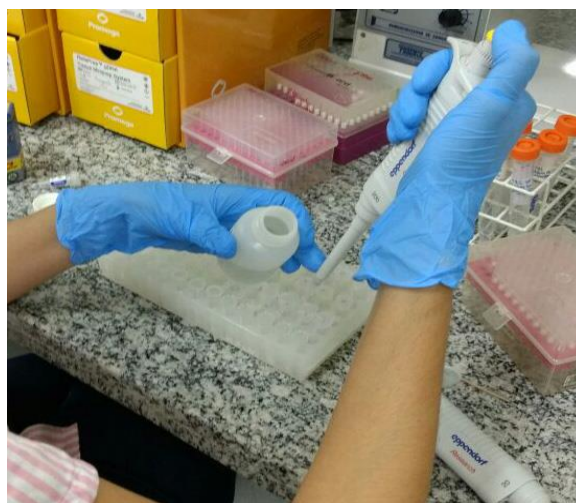


FIGURA 17. Pipetagem de tampão de lise para extração de DNA com o kit Relia Prep™ gDNA Tissue (Promega™). Fonte: arquivo pessoal.



FIGURA 18. Espectrofotômetro Nanodrop (ND-1000) para quantificação das amostras extraídas. Fonte: arquivo pessoal.

4.3 Testes moleculares

Para a realização de pesquisa de DNA para *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* e *Mycobacterium* spp. foi utilizada a técnica de PCR, pois essa metodologia possibilita o sequenciamento para confirmação dos patógenos. No entanto, para *cyanobacteria*, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real. Ainda, o laboratório possui controle positivo já sequenciado para *Cyanobacteria*, o qual foi gentilmente cedido por pesquisadores da Universidade de Copenhagen, Dinamarca.

4.3.1 *Aeromonas hydrophila*

A seleção dos *primers* para a reação de PCR foi feita a partir de pesquisa em literatura científica e sua escolha foi fundamentada em genes de virulência da bactéria. Com isso, foram utilizados os iniciadores que reconhecem o gene *ascV* de *A. hydrophila* (CARVALHO-CASTRO et al., 2010).

Para realização da reação de PCR foram utilizados no mix: 5,3 μL de água livre de ácidos nucleicos, 10 μL de GoTaq Green 1x (PromegaTM), 0,6 μL do *primer ascV sense* (10 pmol/ μL), 0,6 μL do *primer ascV antisense* (10 pmol/ μL), 0,5 μL de DMSO e 3 μL de DNA extraído. Para o controle negativo foi utilizado água livre de ácidos nucleicos e positivo com amostra de tilápia do Nilo infectada naturalmente, proveniente de piscicultura do estado de São Paulo com aeromonose. Esse controle positivo foi obtido durante projeto de pesquisa (*Improved quality of cultured fish for human consumption*, FAPESP:

2013/50504-5) que avalia sanidade de tilápias do estado de São Paulo, no qual foram avaliadas somente tilápias, e as amostras positivas por testes microbiológicos convencionais e moleculares foram utilizadas no presente estudo.

A condição da reação foi realizada conforme descrito por Carvalho-Castro et al. (2010): desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 58°C por 1:30 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. A visualização da amplificação foi feita em gel de agarose a 1,5% sob a luz ultravioleta.

4.3.2 *Edwardsiella tarda*

Os *primers* selecionados para a pesquisa de *E. tarda* foram escolhidos para o gene de virulência da maior subunidade da fímbria dessa bactéria (GRIFFIN et al., 2013). Para realização da reação de PCR foram utilizados no mix: 5,8 µL de água livre de ácidos nucleicos, 10 µL de GoTaq Green 1x (Promega™), 0,6 µL do *primer* EtfimDF (10 pmol/µL), 0,6 µL do *primer* EtfimDR (10 pmol/µL) e 3 µL de DNA extraído. Para o controle negativo foi utilizado água livre de ácidos nucleicos e positivo com amostra de tilápia do Nilo infectada naturalmente, proveniente de piscicultura do estado de São Paulo com edwardsielose. Esse controle positivo foi obtido durante um projeto de pesquisa (*Improved quality of cultured fish for human consumption*, FAPESP: 2013/50504-5) que avalia sanidade de tilápias do estado de São Paulo, no qual foram avaliadas somente tilápias e as amostras positivas por testes microbiológicos convencionais e moleculares foram utilizadas no presente estudo.

A condição da reação foi realizada conforme descrito por Griffin et al. (2013): desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. A visualização da amplificação foi realizada em gel de agarose a 1,5% sob a luz ultravioleta.

4.3.3 *Mycobacterium* spp.

Para a detecção e identificação de *Mycobacterium* foi selecionado um par de *primers* que reconhecem diversas espécies dessa bactéria que acometem peixes, humanos e também podem ser encontrados no meio ambiente (CHEN et al., 2013). Assim, foram desenhados os iniciadores para a região 16S ribossomal, que é conservada para esses micro-organismos. Para realização da reação de PCR foram utilizados no mix: 5,3 µL de água livre de ácidos nucleicos, 10 µL de GoTaq Green 1x (Promega™), 0,6 µL do *primer* Myc16SrRNAF (10 pmol/µL), 0,6 µL do *primer* Myc16SrRNAR (10 pmol/µL), 0,5 µL de DMSO e 3 µL de DNA extraído. Para o controle negativo foi utilizado água livre de ácidos nucleicos e positivo com amostra de tilápia do Nilo infectada naturalmente.

A condição da reação foi feita conforme descrito por Chen et al. (2013): desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minutos e extensão final a 72°C por 6 minutos. A visualização da amplificação foi realizada em gel de agarose a 1,5% sob a luz ultravioleta.

4.3.4 Cianobactérias

Os *primers* utilizados para detecção de cianobactérias foram desenhados a partir de iniciadores que reconhecem os genes responsáveis pela produção de toxinas, substâncias causadoras de doenças nos peixes e em humanos (AL-TEBRINEH et al., 2012). Para a amplificação de cianobactérias foram utilizados os *primers* que reconhecem o gene 16S rRNA desenhados por Al-Tebrineh et al. (2012). Para tanto, foi utilizado para o mix da reação: 10 µL de GoTaq qPCR Mastermix 2x (Promega™), 0,5 µL de cada *primer* (16 S rRNA f e 16S rRNAr) a 0,2 µM, 5 µL de água livre de ácidos nucleicos e 4 µL de amostra extraída. Para o controle negativo foi utilizado água livre de ácidos nucleicos e positivo, amostra de água positiva para esse micro-organismo.

As condições de reação ocorreram conforme descrito por Al-Tebrineh et al. (2012), com desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Para avaliação da positividade da amostra foi adicionada a ciclagem da curva de dissociação. Dessa forma, a avaliação para a presença de cianobactérias foi feita pela curva de amplificação e de dissociação. A reação foi realizada no termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).

4.4 Sequenciamento

As amostras amplificadas para *Mycobacterium* spp. foram submetidas à purificação utilizando o kit PCR Clean-up, Gel Extraction, da Machery-Nagel™, seguindo as recomendações do fabricante, para confirmação do patógeno. A relação de pureza (260/280 e 260/230) e quantificação das amostras purificadas foi conduzida no espectrofotômetro Nanodrop 2000™. Somente foram aceitas amostras purificadas com relação maior que 1,7. A quantificação foi baseada nas recomendações do fabricante (Applied Biosystems) do sequenciador ABI 3500™ (Tabela 1), o qual estima a concentração mínima baseado no tamanho do produto amplificado.

TABELA 1. Concentração ideal para submissão de amostras para sequenciamento no equipamento ABI 3500™ (Applied Biosystems).

Tamanho do produto de PCR (pb)	Concentração (ng/μL)
100-200	3
200-500	5-10
500-1000	10-20
1000-2000	20-40
>2000	40-100

As amostras purificadas e quantificadas foram submetidas ao sequenciamento pelo método de Sanger. A reação para sequenciamento foi realizada com o kit ABI Big Dye Terminator Chemistry (Applied Biosystems™), seguido de eletroforese em capilar (Applied Biosystems, ABI 3500™). A qualidade dos eletroferogramas foi avaliada pelo software Sequencing Analysis versão 5.4, alinhadas em ClustalW no programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 5.1. As sequências foram comparadas usando o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) com os dados depositados no genbank utilizando o programa Genious 7.0.6.

4.5 Análise estatística

O presente trabalho se trata de estudo descritivo relacionado à detecção de bactérias com importância em Saúde Pública. Sendo assim, os dados foram avaliados de acordo com a sua prevalência. A partir dos resultados de prevalência, foram elaborados gráficos no programa GraphPad Prisma v. 5 para melhor visualização.

5. RESULTADOS

As amostras de filés de tilápia do Nilo analisadas não apresentaram nenhuma alteração macroscópica digna de nota e pela reação de PCR foram negativas para *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda*.

Com relação a *Mycobacterium* spp., todas as amostras foram positivas (Figura 19) e a reação apresentou produtos inespecíficos que podem ser a amplificação de DNA genômico do hospedeiro. No entanto, este fato não interferiu na análise, pois o tamanho selecionado como positivo apenas amplifica *Mycobacterium* spp. A reação foi realizada uma única vez, pois a PCR para esse patógeno já está padronizada no laboratório.

Após o sequenciamento pelo método de Sanger, foi confirmada que a espécie de *Mycobacterium* se tratava de *M. gordonae* (número de acesso: MF472702). A sequência apresentou 93% de identidade, confirmando a presença do patógeno.

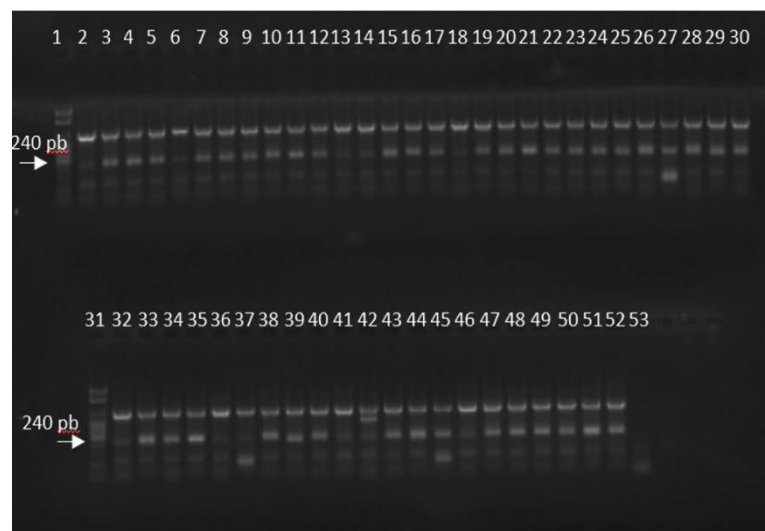


FIGURA 19. Gel de eletroforese para visualização de produtos amplificados para *Mycobacterium* spp. 1 e 31: marcador de peso molecular de 50 pb. 2-51: amostras positivas. 52: controle positivo. 53: controle negativo (água livre de ácidos nucleicos).
Fonte: arquivo pessoal.

Das 50 amostras analisadas, 24 (48%) filés foram positivos para cianobactérias (Figura 20 e 21), sendo que as amostras 10 e 42 apresentaram menor concentração e a 32, a maior concentração do micro-organismo (Tabela 2). Embora tenha ocorrido amplificação inespecífica de alguns produtos, não houve prejuízo na análise, tendo em vista que a curva de dissociação é usada para confirmação do diagnóstico quando é utilizado Sybr Green. Essa análise avalia a temperatura de *melting*, ou seja, a temperatura onde metade das fitas estão desnaturadas e quando ocorre a ligação do *primer* com a

sequência alvo, demonstrando especificidade da reação. Para determinação das amostras positivas, o manual do termociclador de PCR em tempo real recomenda que seja aceita a variação de até $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$.

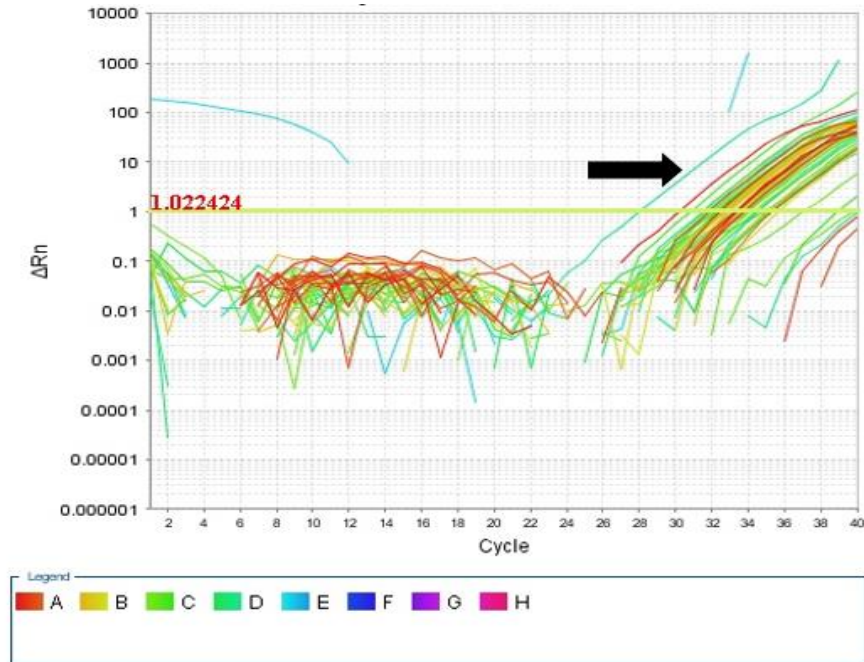


FIGURA 20. Curva de amplificação para *cyanobacteria*. Observa-se que apenas algumas amostras (seta) amplificaram na reação. Fonte: arquivo pessoal.

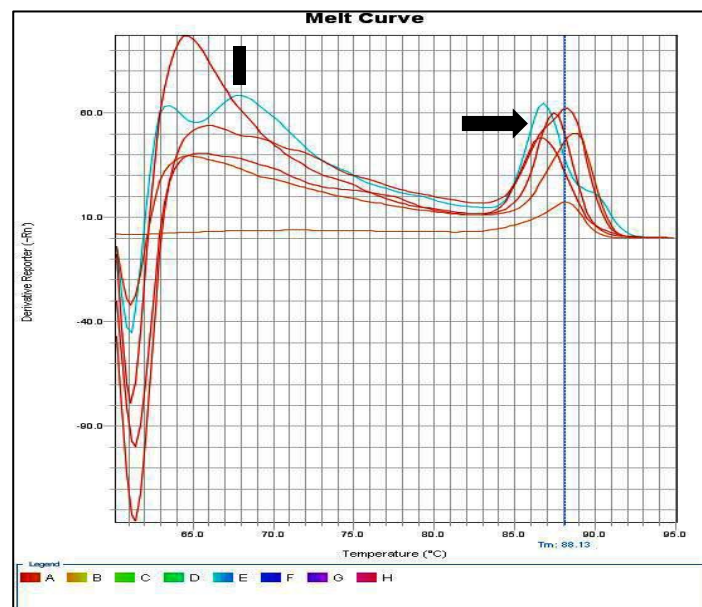


FIGURA 21. Curva de dissociação para *cyanobacteria*. Observa-se que as amostras positivas (seta) amplificaram adequadamente com relação ao controle positivo. Nota-se que houve amplificação inespecífica (I). Fonte: arquivo pessoal.

TABELA 2. Valores de ciclo de amplificação (Cq) nas amostras positivas para cianobactérias amplificadas por qPCR.

Amostra	Cq
2	33,45
3	33,46
4	32,52
8	33,77
10	35,46
12	33,89
14	33,45
16	35,14
17	33,14
18	33,80
19	32,64
20	33,45
23	32,81
24	33,64
25	34,24
27	34,45
32	32,15
34	33,48
38	34,62
40	34,08
41	32,46
42	35,43
44	32,75
49	34,61
Média	33,70
Desvio Padrão	0,92

6. DISCUSSÃO

6.1 *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda*

A. hydrophila é amplamente distribuída no meio ambiente (DASKALOV, 2006), sendo responsável por infectar e causar doença em diversas espécies (SWANN e WHITE, 1991; GOSLING, 1996; AUSTIN e ADAMS, 1996).

Diversos estudos envolvendo a ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em peixes demonstraram alta prevalência, como é o caso dos experimentos realizados nos Estados Unidos por Wang e Silva (1999) 36.1%, no Reino Unido, por Fricker e Tompsett (1989) 19.14%, na Nova Zelândia, por Hudson et al. (1992) 28.0%, na Turquia, por Sağlam et al., (2006) 35.0%, na Índia, por Vivekanandhan et al. (2004) 33,58% e em Taiwan, por Tsai e Chen (1996) 22,2%. Em contraste aos altos valores relatados acima, Castro-Escarpulli et al. (2003) verificaram prevalência de *A. hydrophila* em 2,6% dos peixes amostrados (em um total de 250 amostras). Nagar et al. (2011) verificaram a presença deste agente em 3,85% das 52 amostras colhidas de peixes de água doce. Em estudo conduzido na Turquia por Kahraman et al. (2017), no qual foram analisados 400 peixes crus de diversas espécies (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Salmo salar*, *Pomatomus saltatrix* e *Trachurus mediterraneus*) verificou-se positividade das amostras para *Aeromonas hydrophila*, em 15 das 400 amostras (3,75%).

Assim como *A. hydrophila*, *Edwardsiella tarda* é um agente frequentemente presente em diversas espécies de peixes marinhos e de água doce, assim como em diversas outras espécies de vertebrados (HOSHINA, 1962; LEHANE e RAWLIN, 2000; MOHANTY e SAHOO, 2007), apresentando ampla distribuição mundial (HAWKE e KHOO, 2004).

Kumar et al. (2016) analisaram a prevalência de *E. tarda* em 35 espécies comerciais de peixes da Índia, totalizando 280 amostras, compreendidas em brânquias (106), pele (84), intestino (77), músculo (11) e rim (2). Dentre tais amostras, o intestino apresentou maior incidência de *E. tarda* (12,98%), seguidos pelas brânquias (6,60%) e pele (2,38%), sendo que as amostras de músculo e rins foram negativas para o agente.

Galal et al. (2005) relataram maior presença de *E. tarda* em *Oreochromis niloticus* nos rins, baço e fígado, seguido do intestino. Entretanto, o agente foi negativo para as amostras de brânquias e da musculatura dorsal.

Em estudo realizado por Muratori et al. (2000), no qual foram analisadas 540 tilápias do Nilo criadas em sistema de consórcio com suínos (uso de fezes suínas para alimentação dos peixes), houve positividade para *E. tarda* nas superfícies externas

(17,20% - amostra composta por 25g de pele, brânquias, nadadeiras e opérculo), músculo (14,30%) e intestino (11,20%).

No presente experimento, nenhuma das amostras de músculo de *Oreochromis niloticus* foi positiva para *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda*.

As diferenças relativas às taxas de prevalência entre os diferentes estudos pode ser devida a uma série de fatores, incluindo localização geográfica (nenhum dos estudos acima foi conduzido no Brasil, exceto pelo estudo de Muratori et al., 2000), espécies utilizadas na amostragem (diversas espécies vs. *O. niloticus*), ambiente de procedência dos peixes coletados (lagoas, mar), condição de saúde dos animais amostrados (coleta realizada a partir de animais com sintomatologia compatível com doença por *A. hydrophila* ou *E. tarda* vs. coleta de peixes saudáveis), órgão amostrado (músculo, fígado, rim, baço, pele, brânquias, nadadeiras, rins), metodologia de análise (métodos de confirmação químicos e/ou microbiológicos vs. técnicas moleculares), além das condições sanitárias específicas dos locais onde as amostras foram colhidas.

6.2 *Mycobacterium* spp.

Poucos estudos disponíveis na literatura se destinaram a investigar a ocorrência de micobactérias em amostras de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) prontas para o consumo, provenientes de populações de peixes clinicamente saudáveis. A maioria dos estudos envolveu populações de peixes que apresentaram sinais clínicos de micobacteriose, provenientes de aquicultores e incubadoras de peixe (TESKA et al., 1997; SANDERS e SWAIM, 2001; ANTYCHOWICZ et al., 2003).

O presente estudo se propôs a analisar filés obtidos de exemplares sadios de tilápia do Nilo, destinados ao consumo humano. Destes, 100% foram positivos para *Mycobacterium gordonae*. As altas taxas de prevalência encontradas para o agente no presente estudo podem, em parte, estar relacionadas ao sistema de criação a que esta espécie de peixe é comumente submetida, ou seja, em tanques, com alta densidade populacional. As populações de peixes em alta densidade nas fazendas levam à perda de qualidade da água, com o aumento da poluição orgânica, acarretando em maior ocorrência de micobactérias. Este fator foi associado à ocorrência frequente de várias espécies de micobactérias em aquários de água doce e em tanques de reprodução (PATTYN et al., 1971; BERAN et al., 2006; TSAI et al., 2007).

De acordo com Falkinham III (2016), talvez o exemplo mais conhecido de adaptação micobacteriana seja a aquisição de resistência a condições anaeróbicas. A redução gradual na concentração de oxigênio em culturas não afeta a sobrevivência das células, em virtude de sua capacidade de entrar em um estágio de dormência (DICK et

al., 1998).

A persistência de micobactérias em vários ambientes criados pelos humanos (por exemplo, sistemas de distribuição de água potável) se deve a vários fatores, como a capacidade de sobreviver em ambientes com níveis muito baixos de nutrientes, sua diversidade nutricional, à formação de biofilmes e à resistência aos desinfetantes. O uso de desinfetantes em sistemas de água potável ou a introdução de poluentes de hidrocarbonetos em solos e na água parecem atuar como agentes seletivos, levando à proliferação e dominância final das micobactérias nesses habitats. É provável que as atividades humanas (como desinfecção e poluição) estejam provocando a seleção de micobactérias, no momento em que o envelhecimento das populações e o aumento da prevalência de indivíduos imunodeficientes irão predispor mais indivíduos à infecção e doença (FALKINHAM III, 2016).

Segundo Mrlik et al. (2012), locais de criação com alta densidade populacional de peixes atuam como ambientes poluídos organicamente, onde número abundante de micobactérias, contendo ampla gama de espécies desse gênero, são esperadas. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores isolaram pelo menos seis espécies de micobactérias a partir da água de lagoas de criação, a saber: *M. gordonae*, *M. chimaera*, *M. intracellulare*, *M. kumamotonense*, *M. montefiorensis* e *M. nebraskense*.

Pavlik e Falkinham (2009) propõem que a rota de contaminação dos peixes por tais micobactérias pode se dar pela lixiviação, uma vez que tais bactérias também estão presentes no solo e assim, seriam levadas pelas águas até as lagoas de criação. Uma vez nas lagoas, entrariam em contato com os peixes, pelas brânquias e pele.

Segundo Eckburg et al. (2000), *M. gordonae* é comumente encontrado na água, considerado colonizador normalmente não patogênico, o qual, quando recuperado em cultura, é considerado de menor significado clínico ou contaminante, sendo geralmente difícil distinguir infecção de colonização, uma vez que a bactéria é encontrada em todos os tipos de ambientes.

Entretanto, relatos de literatura apontam o envolvimento deste agente em infecções em humanos, as quais geralmente estão associadas a pacientes imunodeficientes, acometendo os pulmões, tecidos moles, córnea e cavidade peritoneal (GARCIA-FORCADA et al., 1991; WEINBERGER et al., 1992), além de poder causar, em menor proporção, doença disseminada e bacteremia (CHAN et al., 1984; BERNARD et al., 1992; BONNET et al., 1996). Fatores de risco para a colonização do trato respiratório ou doença pulmonar por *M. gordonae* não foram definidos até o momento. A arquitetura anormal dos pulmões e imunidade do hospedeiro podem desempenhar fatores importantes (WEINBERGER et al., 1992).

Embora grande parte dos relatos enfatize a maior predisposição de infecção por pacientes imunocomprometidos, diversos pesquisadores relataram infecções em pacientes imunocompetentes, a maior parte delas associadas a doenças pulmonares, incluindo infecção pulmonar (MAZUMDER et al., 2010), nódulo pulmonar e pneumonia granulomatosa necrótica (ASIJA et al., 2011) e doença pulmonar (ALBAYRAK et al., 2012; ADZIC-VUKICEVIC et al., 2018).

No Brasil, os controles oficiais do pescado e seus produtos requerem a análise dos indicadores de frescor, controle de histamina (nas espécies formadoras), controle de biotoxinas ou de outras toxinas perigosas para a saúde humana, além do controle de parasitas (BRASIL, 2017). Entretanto, pelo fato de grande parte dos patógenos bacterianos não causar qualquer alteração macroscópica nos filés de pescado, sua detecção pelos métodos tradicionais de inspeção torna-se impraticável.

É impossível ignorar o crescimento e o desenvolvimento da aquicultura brasileira e a importância dessa atividade como fonte de alimento. Contudo, o crescimento, sem a aplicação de boas práticas, pode gerar o aumento da produtividade do setor; com isso, o risco de ocorrência de doenças também aumenta (DE PEREZ, 2017).

A maior parte das doenças de animais aquáticos no Brasil possuem caráter endêmico e/ou desconhecido (BRASIL, 2013). O país tem registrado elevado número de doenças causadas por bactérias e vírus, porém o conhecimento desses agentes ainda é restrito. Algumas dessas doenças podem, inclusive, ser de notificação obrigatória (DE PEREZ, 2017).

Devido à evidência de *M. gordonae* como possível agente infeccioso em humanos, estudos adicionais são necessários a fim de avaliar o real risco apresentado por este patógeno, quando ingerido a partir dos alimentos, tanto em pessoas imunossuprimidas quanto em pessoas saudáveis. Deve-se ainda levar em consideração a crescente mudança dos hábitos alimentares da população, com diferentes formas de preparo e consumo do pescado, inclusive na forma crua.

6.3 Cianobactérias

Além de representar uma grave ameaça aos suprimentos globais de água doce, as cianotoxinas contidas nos tecidos de peixes podem apresentar uma via alternativa de exposição a humanos. Entretanto, esse mecanismo ainda é mal compreendido, uma vez que poucos estudos determinaram a concentração de cianotoxinas no tecido muscular de peixes tipicamente consumidos por humanos (MAGALHÃES et al., 2001; XIE et al., 2004; WOOD et al., 2006). Em vez disso, a maior parte dos estudos documentaram níveis de

toxina nos tecidos onde ocorre agregação de cianotoxinas, como a microcistina em tecido hepático (KOTAK et al., 1996; ZIMBA et al., 2001; IBELINGS et al., 2005).

No presente estudo, foi constatada a presença de cianobactérias em 48% das amostras (24/50) coletadas em músculos de *O. niloticus*, a partir de filés destinados ao consumo humano.

Em estudo realizado por Magalhães et al. (2003) na Baía de Sepetiba, RJ, foram coletadas amostras mensais de músculo de várias espécies de peixes e crustáceos destinados ao consumo humano (1 amostra = pool de cinco animais, 5g de músculo de cada), durante 11 meses e foi constatado que 19% das amostras apresentaram concentração de cianotoxinas superior ao limite de ingestão diário estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (0,04 µg/kg/dia de peso corporal).

Jia et al. (2014) estudaram a presença de cianotoxinas em 46 amostras de músculos obtidas de quatro espécies de peixes (*C. carpio*, *H. molitrix*, *C. auratus*, *A. nobilis*) e verificaram que os limites máximos diários descritos acima foram excedidos em 55,6% das amostras de músculo.

Bukaveckas et al. (2017) analisaram amostras de músculos de peixes de importância comercial, coletados na costa leste dos Estados Unidos, e também em um estuário do mar Báltico, onde se verificou a presença de microcistina em concentrações acima do limiar de ingestão diária tolerável para esta molécula.

Casos clínicos de intoxicação por microcistina em humanos indicaram que a microcistina é uma potente hepatotoxina, a qual pode desencadear insuficiência hepática aguda, embora as intoxicações em geral sejam raras (POURIA et al., 1998).

Atividades recreativas com consumo acidental de água contendo níveis moderadamente elevados de Microcistina-LR (MC-LR) poderiam levar à toxicidade em populações vulneráveis, incluindo crianças, populações geneticamente predispostas (LI et al., 2012) e pacientes com doença hepática em curso. Uma vez que os pacientes são submetidos rapidamente a falência hepática aguda após a intoxicação aguda por MC-LR, mesmo a exposição a níveis muito baixos poderia resultar em taxas de morbidade e mortalidade muito elevadas a partir do contato de pessoas com uma fonte de água contaminada, devido à probabilidade de múltiplas espécies de microcistina estarem presentes simultaneamente na água (WOOLBRIGHT et al., 2017).

Poste et al. (2011) verificaram que a microcistina está presente na água e nos peixes de vários lagos de clima tropical e temperado, o que representa perigo aos consumidores, devido ao risco da bioacumulação nesses indivíduos (MAGALHÃES et al., 2003; XIE et al., 2007).

As microcistinas são extremamente importantes, não apenas pelo seu potencial de causar intoxicação aguda, mas também pela capacidade de promover formação tumoral pela exposição crônica em baixas concentrações em água potável contaminada (SVIRČEV et al., 2009; ZHOU et al., 2002; MAATOUK et al., 2004). Em 2006, em Lyon, na França, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) realizou avaliação da MC-LR e concluiu que esta molécula é um possível carcinógeno para humanos, classificando-o como um carcinogênico 2B (IARC, 2006), demonstrando a importância da pesquisa dessa toxina em filés de peixes destinados ao consumo humano.

A melhor maneira de reduzir a ocorrência de cianotoxinas no pescado é controlar as florações de cianobactérias, uma vez que nenhuma ou pouca cianotoxina se acumularia nos organismos aquáticos. Está bem estabelecido que a intensidade das florações tem aumentado como consequência de eutrofização antropogênica mundial (ou seja, enriquecimento de corpos d'água com nutrientes fertilizantes, particularmente o fósforo) (IBELINGS e CHORUS, 2007).

Na aquicultura intensiva, a capacidade natural de suporte dos tanques é bastante excedida. Como a aquicultura trata do cultivo intensivo de organismos, são estabelecidos processos ecológicos artificiais em função da manipulação do ambiente aquático. Devido à alta densidade de peixes ou camarões cultivados para atender a aquicultura comercial lucrativa, os tanques recebem grandes aportes de nutrientes pelo acúmulo de ração não consumida (ZIMBA e GRIMM, 2003). Além disso, a excreção dos organismos cultivados, mineralização natural e ressuspensão do sedimento aumentam o estoque de fósforo na água. Os peixes poderiam assimilar apenas 20-27% do nitrogênio e 8-24% do fósforo lançados no sistema durante o cultivo. Do estoque total destes nutrientes nos tanques, a ração dos peixes contribui com 90-98% do nitrogênio e 97-98% do fósforo. No sedimento, foram encontrados de 54-77% de nitrogênio e 72-89% do fósforo, resultantes do acúmulo de ração no fundo (AFSAR, 2008).

No Brasil, a presença de cianobactérias em águas destinadas à aquicultura, bem como as concentrações de fósforo total e nitrogênio amoniacal total são regulamentadas pela Resolução nº 357, de 17/03/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a qual estipula como limite o valor de 50.000 células/mL ou 5 mm³/L para a densidade de cianobactérias no meio (Fósforo total = 0,020 mg/L; Nitrogênio = 1,27 mg/L, ambos em ambientes lênticos).

Com relação aos controles oficiais do pescado e seus produtos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) prevê a análise dos indicadores de frescor, o controle de histamina (nas espécies formadoras), controle de biotoxinas ou de

outras toxinas perigosas para a saúde humana, além do controle de parasitas (BRASIL, 2017). Entretanto, pelo fato das cianobactérias não apresentarem alterações macroscópicas nos filés de pescado, sua detecção pelos métodos tradicionais de inspeção é improvável. Assim, produtores e autoridades responsáveis pela fiscalização dos parâmetros de qualidade da água e do pescado devem atentar para a importância da presença desses agentes no ambiente de cultivo.

Estudos adicionais são necessários a fim de detectar e quantificar as cianotoxinas nos filés de tilápia do Nilo disponibilizadas ao consumo humano no varejo, de forma a verificar se estas, caso presentes, representam risco à saúde humana, ou seja, se sua concentração está acima dos valores máximos de ingestão diária para cianotoxinas estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde.

7. CONCLUSÕES

- As amostras de músculo de filés de tilápia do Nilo do presente estudo não apresentaram *Edwardsiella tarda* e *Aeromonas hydrophila* aos exames moleculares de PCR;
- A taxa de prevalência de cianobactérias em músculo de filés de tilápia do Nilo foi de 48% à PCR em tempo real (qPCR);
- 100% dos filés de tilápia do Nilo amostrados no presente estudo revelaram ser positivos para *Mycobacterium gordonae* aos exames moleculares de PCR;
- Tendo em vista os resultados obtidos, estudos adicionais são necessários para detecção de agentes patogênicos de importância em saúde pública em filés de tilápia, tendo em vista o crescente hábito do consumo “*in natura*” pela população.

8. BIBLIOGRAFIA (ABNT)

ADZIC-VUKICEVIC, T.; BARAC, A.; BLANKA-PROTIC, A.; LABAN-LAZOVIC, M.; LUKOVIC, B.; SKODRIC-TRIFUNOVIC, V.; RUBINO, S. Clinical features of infection caused by non-tuberculous mycobacteria: 7 years' experience. *Infection*, p.1-7, 2018.

AGNEW, W.; BARNES, A. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*, v.122. p.1-15, 2007.

ALBAYRAK, N.; SIMŞEK, H.; SEZEN, F.; ARSLANTÜRK, A.; TARHAN, G.; CEYHAN I. Evaluation of the distribution of non-tuberculous mycobacteria strains isolated in National Tuberculosis Reference Laboratory in 2009-2010, Turkey. *Mikrobiyoloji Bülteni*, v.46, p.560-567, 2012.

ALI, H.; MIAH, F.; PRODHAN, S.H.; RAHMAN, M.; RAIHAN, J.; ZINNAH, K.M.A.; AUNKOR, T.H.; RAHMAN, J.; RUMA, F.B.; CHOWDHURY, N. Putative virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from marketed fish intended for human consumption in Bangladesh. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Science*, v.16, p.485-495, 2014

AL-TEBRINEH, J.; PEARSON, L.A.; YASAR, S.A.; NEILAN, B.A. A multiplex qPCR targeting hepato- and neurotoxigenic cyanobacteria of global significance. *Harmful Algae*, v.15, p.19-25, 2012.

ANDREU, A.; MARTÍN, N.; GONZALEZ, T.; FERNANDEZ, F. Ecología de las micobacterias atípicas en la ciudad de Barcelona. *Gaceta Sanitária*, v.9, p.103-106, 1983.

AFSAR, A. Blue-Green Algae Management in Aquaculture. Phoslock®. Phoslock Water Solution Limited. ABN 88 099 555 290. Fevereiro de 2008. Disponível em: www.phoslock.com.au/site/content/pdf/bluegreenalgaemanagementinaquaculture.pdf

ARAKAWA, C.K.; FRYER, J.L. Isolation and characterization of a new subspecies of *Mycobacterium chelonae* infectious for salmonid fish. *Helgolander Meeresunters*, v.37, p.329-342, 1984.

ARAKAWA, C.K.; FRYER, J.L.; SANDERS, J.E. Serology of *Mycobacterium chelonae* isolated from salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, v.9, p.269-271, 1986.

ARAMBULO, P.V.; WESTERLUND, N.C.; SARMIENTO, R.V. On the isolation of human enteric organisms from the bile of pigs and cattle. *Acta Medica Philippina*, v.5, p.84-86, 1968.

ASHFORD, R.U.; SARGEANT, P.D.; LUM, G.D. Septic arthritis of the knee caused by *Edwardsiella tarda* after a catfish puncture wound. *The medical Journal of Australia*, v.168, p.443-444, 1998.

ASIJA, A.; PRASAD, A.; ESKRIDGE, E. Disseminated *Mycobacterium gordonae* infection in an immunocompetent host. *American Journal of Therapeutics*, v.18, p.75-77, 2011.

ASTROFSKY, K.M.; SCHRENZEL, M.D.; BULLIS, R.A.; SMOLOWITZ, R.M.; FOX, J.G. Diagnosis and management of atypical *Mycobacterium* spp. infections in established laboratory zebrafish (*Brachydanio rerio*) facilities. *Comparative Medicine*, v.50, p.666-672, 2000.

AUSTIN, B.; ADAMS, C. Fish Pathogens. In: AUSTIN, B.; ALTWEGG, M.; GOSLING, P.J.; BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; LOVELL, R.,A.; VALENTINE, W.M. Algae intoxication in livestock and waterfowl. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.5, p.345-361, 1989.

BARBER, T.W.; CRAVEN, D.E.; FARBER, H.W. *Mycobacterium gordonae*: a possible opportunistic respiratory tract pathogen in patients with advanced human immunodeficiency virus type I infection. *Chest*, v.100, p.716-720, 1991.

BARTLETT, J.M.S.; STIRLING, D. Methods in molecular biology. In: *PCR Protocols*, v. 226, 2^a. ed. Humana Press Inc. 2003.

BERAN, V.; MATLOVA, L.; DVORSKA, L.; SVASTOVA, P.; PAVLIK, I. Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium environment. *Journal of Fish Diseases*, v.29, p.383-393, 2006.

BERNARD, E.; MICHIELS, I.F.; PINIER, Y.; BOURDET, I.F.; DELLAMONICA, P. Disseminated infection as a result of *Mycobacterium gordonae* in an AIDS patient. *AIDS*, v.6, p.1217-1218, 1992.

BONNET, E.; MASSIP, P.; BAURIAUD, R.; ALRIC, L.; AUVERGNAT, J-C. Disseminated *Mycobacterium gordonae* Infection in a Patient Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Infectious Diseases*, v.23, p.644-645, 1996.

BRAGG, R.R.; HUCHZERMEYER, H.F.A.K.; HANISCH, M.A.M. *Mycobacterium fortuitum* isolated from three species of fish in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v.57, p.101-102, 1990.

BRUNO, D.W.; GRIFFITHS, J.; MITCHELL, C.G.; WOOD, B.P.; FLETCHER, Z.J.; DROBNIEWSKI, F.A.; HASTINGS, T.S. Pathology attributed to *Mycobacterium chelonae* infection among farmed and laboratory infected Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.33, p.101-109, 1998.

BUKAVECKAS, P.A.; LESUTIENE, J.; GASIUNAITE, Z.R.; LOZYS, L.; OLENINA, I.; PILKAITYTE, R.; PUTYS, Z.; TASSONE, S.; WOOD, J. Microcystin in aquatic food webs of the Baltic and Chesapeake Bay regions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v.191, p.50-59, 2017.

CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, v.8(7), p.1137-1144, 2006.

CARCABA, V.; CARTON, L.A.; FERNANDEZ LEON, A.; DE DIEGO, I. Peritonitis por *Mycobacterium gordonae* en un paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Medicina Clínica (Barc)*, v.93, p.598, 1989.

CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.; BUNNER, D.L.; ELOFF, J.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.; KRISHNAMURTHY, T.; MIN-JUAN, Y.; MOORE, R.E. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, v.26, p.971-973, 1988.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, v.270, p.78-86, 1994.

CARVALHO-CASTRO, G.A.; LOPES, C.O.; LEAL, C.A.G.; CARDOSO, P.G.; LEITE, R.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, v.144, p.371–376, 2010.

CASTRO-ESCARPULLI, G.; FIGUERAS, M.J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNÁNDEZ-RENDÓN, E.; APARICIO, G.O. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, v.84, p.41-49, 2003.

CHAN, J.; MC KITRICK, L.C.; KLEIN, R.S. *Mycobacterium gordonae* in the acquired immunodeficiency syndrome [letter]. *Annals of Internal Medicine*, v.101, p.400, 1984.

CHEN, J.M.; ZHANG, M.; RYBNIKER, J.; BOY-RÖTTGER, S.; DHAR, N.; POJER, F.; COLE, S.T. *Mycobacterium tuberculosis* EspB binds phospholipids and mediates EsxA-independent virulence. *Molecular Microbiology*, v.89, p.1154-1166, 2013.

CHINABUT, S. Mycobacteriosis and nocardiosis. In: Woo, P.T.K., BRUNO, D.W. (Eds.), *Fish Diseases and Disorders*, vol. 3. CABI Publishing, New York, NY, 1999, P.319-340.

CHINABUT, S.; LIMSUWAN, C.; CHANRATCHAKOOL, P. Mycobacteriosis in the snakehead, *Channa striatus* (Fowler). *Journal of Fish Diseases*, v.13, p.531-535, 1990.

CLARRIDGE, J.E.; MUSHER, D.M.; FAINSTEIN, V.; WALLACE, R.J.; JR. Extraintestinal human infection caused by *Edwardsiella tarda*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.11, p.511–514, 1980.

COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; NOBLE, W.C.; YATES, M.D. *Mycobacterium marinum* infections in man. *Journal of Hygiene*, v.94, p.135-149, 1985.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados – Brasília, 2013. 1v, 62p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº. 357, de 17/03/2005 - Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências (2005).

COSTA, M.R.; MOURA, E.F. Manual de extração de DNA. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 24p.

DAOUST, P.-Y.; LARSON, B.E.; JOHNSON, G.R. Mycobacteriosis in yellow perch (*Perca flavescens*) from two lakes in Alberta. *Journal of Wildlife Diseases*, v.25, p.31-37, 1989.

DARWISH, A.; PLUMB, J.A.; NEWTON, J.C. Histopathology and pathogenesis of experimental infection with *Edwardsiella tarda* in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, v.12, p.255-266, 2000.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*, v.17, p.474-483, 2006.

DECOSTERE, A.; HERMANS, K.; HAESBROUCK, F. Piscine mycobacteriosis: a literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. *Veterinary Microbiology*, v.99, p.159–166, 2004.

DE PEREZ, A.C.A. Importância do Médico Veterinário na sanidade aquícola. *Revista CFMV*, v.75, p.8-11, 2017.

DIAMANT, A.; BANET, A.; UCKO, M.; COLORNI, A.; KNIBB, W.; KVITT, H. Mycobacteriosis in wild rabbitfish *Siganus rivulatus* associated with cage farming in the Gulf of Eilat, Red Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.39, p.211-219, 2000.

DOBOS, K. M.; QUINN, F.D.; ASHFORD, D.A.; HORSBURGH, C.R.; KING, C.H. Emergence of a unique group of necrotizing mycobacterial diseases. *Emergent Infectious Diseases*, v.5, p.367–370, 1999.

DOYLE, K. *The Source of Discovery: Protocols and Applications Guide*. Madison, Wis, USA: PROMEGA, 1996.

DUNN, B.L.; HODGSON, D.J. Atypical mycobacteria in milk. *Journal of Applied Bacteriology*, v.52, p.373-376, 1982.

DU MOULIN, G.C.; STOTTMEIER, K.D. Waterborne mycobacteria: an increasing threat to health. *American Society for Microbiology News*, v.52, p.525-529, 1986.

ECKBURG, P.B.; BUADU, E.O.; STARK, P.; SARINAS, P.S.A.; CHITKARA, R.K.; KUSCHNER, W.G. Clinical and chest radiographic findings among persons with sputum culture positive for *Mycobacterium gordonae*: a review of 19 cases. *Chest*, v.117, p.96-102, 2000.

EDBERG, S.C.; BROWNE, F.A.; ALLEN, M.J. Issues for microbial regulation: *Aeromonas* as a model. *Critical Reviews in Microbiology*, v.33, p.89–100, 2007.

EGUSA, S. Some bacterial diseases of freshwater fishes in Japan. *Fish Pathology*, v.10, p.103-114, 1976.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2001.

ENGEL, J.J.; MARTIN, T.L. *Edwardsiella tarda* as a cause of postdysenteric ulcerative colitis. *International Journal of Colorectal Disease*, v.21, p.184-185, 2006.

ERDEM, B.; KARIPTAS, E.; KAYA, T. Siderophore, hemolytic, protease, and pyrazinamidase activities and antibiotic resistance in motile *Aeromonas* isolated from fish. *Turkish Journal of Biology*, v.34, p.453-462, 2010.

ERIKSSON, J.E.; TOIVOLA, D.; MERILUOTO, J.A.O.; KARAKI, H.; HAN, Y.; HARTSHORNE, D. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v.173, p.1347-1353, 1990.

EVEN-PAZ, Z.; HAAS, H.; SACKS, T.; ROSENMAN, E. *Mycobacterium marinum* skin infections mimicking cutaneous leishmaniasis. *British Journal of Dermatology*, v.94, p.435-442, 1976.

EWING, W.H.; MCWHORTER, A.C.; ESCOBAR, M.R.; LUBIN, A.H. *Edwardsiella*, a new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.15, p.33-38, 1965.

FALKINHAM, J.O. III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v.9, p.177-215, 1996.

FANG, H.M.; GE, H.; SIN, Y.M. Cloning, characterization and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesion. *Fish and Shellfish Immunology* v.16, p.645–658, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) – The State of World Fisheries and Aquaculture (2014) – Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>. Acesso em: 10 de Julho de 2017.

FISCHEDER, R.; SCHULZE-RÖBBECKE, R.; WEBER, A. Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*, v.192, p.154-158, 1991.

FRICKER, C.R.; TOMPSETT, S. *Aeromonas* spp. in foods: A significant cause of food poisoning? *International Journal of Food Microbiology*, v.9, p.17-23, 1989.

FUNARI, E.; TESTAI, E. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, v.38, p.97-126, 2008.

GARCIA-FORCADA, A.; GARCES, J.M.; BERGES, A. Infección pulmonar por *Mycobacterium gordonae* y neumonía por *Pneumocystis carinii* en un paciente afecto de síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Medicina Clínica (Barc)*, v.96, p.518-519, 1991.

GAUTHIER, D.T. Bacterial zoonoses of fishes: A review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. *The Veterinary Journal*, v.203, p.27-35, 2015.

GAUTHIER, D.T.; RHODES, M.W. Mycobacteriosis in fishes: A review. *The Veterinary Journal*, v.180, p.33-47, 2008.

GOSLING, P. J. *Aeromonas* species in disease of animals. In AUSTIN, ALTWEGG, B.; GOSLING, P.J.; JOSEPH, S. (Eds.), *The Genus Aeromonas*. p.175–196, 1996.

GOWEN, R.J. Managing eutrophication associated with aquaculture development. *Journal of Applied Ichthyology*, v.10, p.245-257, 1994.

GRIFFIN, M.J.; QUINIYOU, S.M.; CODY, T.; TABUCHI, M.; WARE, C.; CIPRIANO, R.C.; MAUEL, M.J.; SOTO, E. Comparative analysis of *Edwardsiella* isolated from fish in eastern United States identifies two distinct genetic taxa amongst organisms phenotypically classified as *E. tarda*. *Veterinary Microbiology*, v.165, p.358-372, 2013.

GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; RICHARD, C.; SAKAZAKI, R. *Edwardsiella hoshinae*, a new species of *Enterobacteriaceae*. *Current Microbiology*, v.4, p.347-351, 1980.

HABTAMU, T.; KEBEDE, B. Isolation and Identification of *Edwardsiella tarda* from Lake Zeway and Langano, Southern Oromia, Ethiopia. *Fisheries and Aquaculture Journal*, v.2, 2016.

HAENEN, O.L.M.; EVANS, J.J.; BERTHE, F. Bacterial infection from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, v.32(2), p.497-507, 2013.

HARADA, K.I.; KONDO, F.; LAWATON, L. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. New York: E & FN Spon, p.369-405, 1999.

HARADA, K.I.; TSUJI, K.; WATANABE, M.; KONDO, F. Stability of microcystins from cyanobacteria. Effect of pH and temperature. *Phycologia*, v.35, p.83-88, 1996.

HAWKE, J.P.; KHOO, L.H. Infectious diseases. In: TUCKER, C.S., HARGREAVES, J.A. (Eds.), *Biology and Culture of the Channel Catfish*. Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands, p.387-443, 2004.

HAWKE, J.P.; MCWHORTER, A.; STEIGERWALT, A.G.; BRENNER, D.O.N.J. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.31, p.396-400, 1981.

HEDRICK, R.P.; MCDOWELL, T.; GROFF, J. Mycobacteriosis in cultured striped bass from California. *Journal of Wildlife Diseases*, v.23, p.391-395, 1987.

HERMAN, R.L.; BULLOCK, G.L. Pathology caused by the bacterium *Edwardsiella tarda* in striped bass. *Transactions of American Fisheries Society*, v.115, p.232-235, 1986.

HERRERA, F.C.; SANTOS, J.A.; OTERO, A.; GARCIA-LOPEZ, M.L. Occurrence of foodborne pathogenic bacteria in retail prepackaged portions of marine fish in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, v.100, p.527-536, 2006.

HONKANEN, R.E.; ZWILLER, J.; MOORE, R.E.; DAILY, S.L.; KHATRA, B.S.; DUKELOW, M.; BOYNTON, A.L. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, v.265, p.19401-19404, 1990.

HOSHINA, T. On a new bacterium *Paracolobactrum anguillimortiferum* n. sp. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, v.28, p.162-164, 1962.

HUDSON, J.A.; MOTT, S.J.; DELACY, K.M.; EDRIDGE, A.L. Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat fleshfoods. *International Journal of Food Microbiology*, v.16, p.99-108, 1992.

HUMINER, D.; PITLIK, S.D.; BLOCK, C.; KAUFMAN, L.; AMIT, S.; ROSENFELD, J.B. Aquarium-borne *Mycobacterium marinum* skin infection. *Archives of Dermatology*, v.122, p.698-703, 1986.

HUNTER, B.J.; ROBERTS, D.C.K. Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. *Nutrition Research*, v.20, p.1047-1058, 2000.

IBELINGS, B.W.; BRUNING, K.; DE JONGE, J.; WOLFSTEIN, K.; PIRES, L.M.D.; POSTMA, J.; BURGER, T. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. *Microbial Ecology*, v.49, p.487-500, 2005.

IBELINGS, B.W.; CHORUS, I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution*, v.150, p.177–192, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da Pecuária Municipal 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15 de Março de 2017.

IBRAHEM, M.D.; MOSTAFA, M.M.; ARAB, R.M.H.; REZK, M.A. (2008) p.1257-1270. ELGHOBASHY, H.; FITZSIMMONS, K.; DIAB, A.S. (eds.). Prevalence of *Aeromonas hydrophila* infection in wild and cultured tilapia nilotica (*O. niloticus*) in Egypt. Proceedings of 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Cairo, Egypt, 12-14 Oct 2008. Vol. 2 [open access].

IGBINOSA, H.; IGUMBOR, E.U.; AGHDASI, F.; TOM, M.; OKOH, A.I. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *Scientific World Journal*, p.1-13, 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *The Lancet Oncology*, v.7, p.628-629, 2006.

IVESON, J.B. Strontium chloride B and EE enrichment broth media for the isolation of *Edwardsiella*, *Salmonella* and Arizona species from tiger snakes. *The Journal of Hygiene (Lond)*, v.69, p.323-330, 1971.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. Expression of an iron-regulated hemolysin by *Edwardsiella tarda*. *FEMS Microbiology Letters*, v.111, p.275-280, 1993.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. Infections associated with genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella tarda* in human disease. *Clinical Infectious Diseases*, v.17, p.742–748, 1993.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v.23, p.35–73, 2010.

JIA, J.; LUO, W.; LU, Y.; GIESY, J.P. Bioaccumulation of microcystins (MCs) in four fish species from Lake Taihu, China: Assessment of risks to humans. *Science of the Total Environment*, v.487, p.224-232, 2014.

KAHRAMAN, B.B.; DUMEN, E.; ISSA, G.; KAHRAMAN, T.; IKIZ, S. Incidence of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* in Seafoods. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v.17, p.1309-1312, 2017.

KAO, H.T.; HUANG Y.C.; LIN T.Y. Fatal bacteremic pneumonia caused by *Aeromonas hydrophila* in a previously healthy child. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v.36, p.209–211, 2003.

KHARDORI, N.; FAINSTEIN, V. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. *Annual Review of Microbiology*, v.42, p.395-419, 1988.

KIROV, S.M. *Aeromonas* Species. HOCKING, A.D. (Ed.), *Foodborne microorganisms of public health significance* (sixth ed.), AIFST Inc. (NSW Branch), p.553-575, 2003.

KORKOCA, H.; ALAN, Y.; BOZAR, S.; BERKTAS, M.; GOZ, Y. Detection of putative virulence genes in *Aeromonas* isolates from humans and animals. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v.8, p.1398-1406, 2014.

KOTAK, B.G.; ZURAWELL, R.W.; PREPAS, E.E.; HOLMES, C.F. Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 53, p. 1974-1985, 1996.

KROVACEK, K.; FARIS, A.; BALODA, S.B.; PETERZ, M.; LINDBERG, T.; MANSSON, I. Prevalence and characterization of *Aeromonas* spp. isolated from foods in Uppsala, Sweden. *Food Microbiology*, v.9, p.29–36, 1992.

KUMAR, P.; ADIKESAVALU, H.; ABRAHAM, T.J. Prevalence of *Edwardsiella tarda* in commercially important finfish and shellfish of Bihar and West Bengal, India. *Journal of Coastal Life Medicine*, v. 4, p.30-35, 2016.

LANDSBERG, J.H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fishery Science*, v.10, p.113-390, 2002.

LANKOFF, A.; KRZOWSKI, Ł.; GŁĄB, J.; BANASIK, A.; LISOWSKA, H.; KUSZEWSKI, T.; GÓZDZ, S.; WÓJCIK, A. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v.559, p.131-142, 2004.

LANSDELL, W.; DIXON, B.; SMITH, N.; BENJAMIN, L. Isolation of several *Mycobacterium* species from fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, v.5, p.73-76, 1993.

LAHEY, T. Invasive *Mycobacterium marinum* infections. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, p.1496–1498, 2003.

LAWTON, L.A.; CODD, G.A. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins and their significance in UK and European Waters. *Water and Environment Journal*, v.5, p.460-465, 1991.

LEHANE, L.; RAWLIN, G.T. Topically acquired bacterial zoonoses from fish: a review. *Medical Journal of Australia*, v.173(5), p.256-259, 2000.

LEOTTA, G.A.; PIÑEYRO, P.; SERENA, S.; VIGO, G.B. Prevalence of *Edwardsiella tarda* in Antarctic wildlife. *Polar Biology*, v.32, p.809-812, 2009.

LI, L.M.; CHEN, L.; DENG, G.H.; TAN, W.T.; DAN, Y.J.; WANG, R.Q.; CHEN, W.S. SLCO1B1 *15 haplotype is associated with rifampin-induced liver injury. *Molecular Medicine Reports*, v.6, p.75-82, 2012.

LIM, P.L. Some interesting isolates from a diagnostic laboratory. *Journal of Clinical Pathology*, v.31, p.223-226, 1978.

LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE (LPSN). 2017 – Disponível em: <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>. Acesso em: 30 de Novembro de 2017.

LUND, J.E.; ABERNETHY, C.S. Lesions of tuberculosis in mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*). *Journal of Wildlife Diseases*, v.14, p.222-228, 1978.

MAATOUK, I.; BOUAÏCHA, N.; PLESSIS, M.J.; PÉRIN, F. Detection by ³²P-postlabeling detection of 8-oxo-7, 8-dihydro-20- deoxyguanosine in DNA as biomarker of microcystin-LR and nodularin-induced DNA damages in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver. *Mutation Research*, v.564, p.9-20, 2004.

MACKENZIE, K. Presumptive mycobacteriosis in north-east Atlantic mackerel, *Scomber scombrus* L. *Journal of Fish Biology*, v.32, p.263-275, 1988.

MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G.A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters*, v.264, p.187-192, 1990.

MAGALHÃES, V.F.; MARINHO, M.M.; DOMINGOS, P.; OLIVEIRA, A.C.; COSTA, S.M.; AZEVEDO, L.O.; AZEVEDO, S.M. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, v.42, p.289–295, 2003.

MAGALHÃES, V.F.; SOARES, R.M.; AZEVEDO, S. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, v.39, p.1077-1085, 2001.

MANO, S.B.; ORDOEZ, J.A.; GARCIA DE FERNANDO, G.D. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. *Food Microbiology*, v.17, p.657–669, 2000.

MATEOS, D.; ANGUITA, J.; NAHARRO, G.; PANIAGUA, C. Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Bacteriology*, v.74, p.111–118, 1993.

MAZUMDER, S.A.; HICKS, A.; NORWOOD, J. *Mycobacterium gordonae* pulmonary infection in an immunocompetent adult. *North American Journal of Medical Sciences*, v.2, p.205-207, 2010.

MCDERMOTT, C.M.; NHO, C.W.; HOWARD, W.; HOLTON, B. The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon*, v.36, p.1981-1996, 1998.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMAS, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *International Journal of Food Microbiology*, v.28, p.157–168, 1995.

MEYER, F.P.; BULLOCK, G.L. *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Applied Microbiology*, v.25, p.155-156, 1973.

MIKALSEN, J.; OLSEN, A.B.; RUDRA, H.; MOLDAL, T.; LUND, H.; DJØNNE, B.; BERGH, Ø.; COLQUHOUN, D.J. Virulence and pathogenicity of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* for Atlantic cod, *Gadus morhua* L., and laboratory mice. *Journal of Fish Diseases*, v.32, p.377-381, 2009.

MIKAMO, H.; NINOMIYA, M.; SAWAMURA, H.; TAMAYA, T. Puerperal intrauterine infection caused by *Edwardsiella tarda*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v.9, p.341-343, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (RIISPOA) BRASIL. Regulamento de inspeção Industrial e sanitária de produtos de origem animal. Decreto 9.013, de 29/03/2017 (2017).

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA) – Boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura (2011) – Disponível em: http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim_MPA_2011_pub.pdf. Acesso em 17 de Março de 2017.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA) – Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico de Enfermidades de Animais Aquáticos na Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura – RENAQUA (2013) – Disponível em: <http://www.adepara.pa.gov.br/sites/default/files/MANUAL%20PARA%20COLETA%20E%20REMESSA%20PARA%20AN%C3%81LISE%20LABORATORIAL.pdf>

MINNAGANTI, V.R.; PATEL, P.J.; IANCU, D.; SCHOCH, P.E.; CUNHA, B.A. Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila*. Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care. V.29(4), p.306-308, 2000.

MIYAZAKI, T.; EGUSA, S. Histopathological studies of edwardsiellosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*), 1: suppurative interstitial nephritis form. Fish Pathology, v.11, p.33-43, 1976.

MIYAZAKI, T.; EGUSA, S. Histopathological studies of edwardsiellosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*), 2: suppurative hepatitis form. Fish Pathology, v.11, p.67-75, 1976.

MIYAZAKI, T.; KAIGE, N. Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. Fish Pathology, v.20, p.219-227, 1985.

MIZUNOE, S.; YAMASAKI, T.; TOKIMATSU, I.; MATSUNAGA, N.; KUSHIMA, H.; HASHINAGA, K.; KADOTA, J.I. A case of empyema caused by *Edwardsiella tarda*. Journal of Infection, v.53, p.255-258, 2006.

MOHAMED, Z.A.; CARMICHAEL, W.W.; HUSSEIN, A.A. Estimation of microcystins in the freshwater fish *Oreochromis niloticus* in a Egyptian fish farm containing a *Microcystis* bloom. Environmental Toxicology, v.18, p.137-141, 2003.

MOHAMED, Z.A.; HUSSEIN, A.A. Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: A laboratory study. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.63, p.424-429, 2006.

MOHANTY, B.; SAHOO, P. Edwardsiellosis in fish: a brief review. Journal of Biosciences, v.32, p.1331-1344, 2007.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Série – Biologia molecular atualização. Parte 2 – Uso de Técnicas de biologia molecular para diagnóstico. Einstein. v.2, p.139, 2004.

MRLIK, V.; SLANY, M.; KUBECKA, J.; SEDA, J.; NECAS, A.; BABAK, V.; SLANA, I.; KRIZ, P.; PAVLIK, I. A low prevalence of mycobacteria in freshwater fish from water reservoirs, ponds and farms. Journal of Fish Diseases, v.35, p.497-504, 2012.

MURATORI, M.C.S.; DE OLIVEIRA, A.L.; RIBEIRO, L.P.; LEITE, R.C.; COSTA, A.P.R.; DA SILVA, M.C.C. *Edwardsiella tarda* isolated in integrated fish farming. *Aquaculture Research*, v.31, p.481-483, 2000.

NAGAR, V.; SHASHIDHAR, R.; BANDEKAR, J.R. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Aeromonas* strains from various retail food products in Mumbai, India. *Journal of Food Science*, v.76, p.486-492, 2011.

NIGRELLI, R.F.; VOGEL, H. Spontaneous tuberculosis in fishes and in other cold-blooded vertebrates with special reference to *Mycobacterium fortuitum* Cruz from fish and human lesions. *Zoologica: New York Zoological Society*, 48, p.131-144, 1963.

NOGA, E.J.; WRIGHT, J.F.; PASARELL, L. Some unusual features of mycobacteriosis in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Comparative Pathology*, v.102, p.335-343, 1990.

NOGA, E. Diagnoses made by bacterial culture of kidney or affected organs. In: NOGA, E, editor. *Fish disease, diagnosis and treatment*. 2nd edition. Ames (IA): Iowa State University Press; 2010, p.185-190.

NUCCI, C.; SILVERIA, W.D.; CORREA, S.S.; NAKAZATO, G.; BANDO, S.Y.; RIBEIRO, M.A.; CASTRO, A.F.P. Microbiological comparative study of isolates of *Edwardsiella tarda* isolated in different countries from fish and humans. *Veterinary Microbiology*, v.89, p.29-39, 2002.

OSMAN, K.; ALY, M.; KHEADER, A.; MABROK, K. Molecular detection of the *Aeromonas* virulence aerolysin gene in retail meats from different animals sources in Egypt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.28, p.1863-1870, 2012.

PALUMBO, S. The *Aeromonas hydrophila* group in food. AUSTIN, B.; ALTWEGG, M.; GOSLING, P.J.; JOSEPH, S. *The genus aeromonas*, John Wiley & Sons, Ltd, p.287-310, 1996.

PARKER, J.; SHAW, J. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *Journal of Infection*, v.20, p.1-10, 2010.

PAVAGADHI, S.; BALASUBRAMANIAN, R. Toxicological evaluation of microcystins in aquatic fish species: current knowledge and future directions. *Aquatic Toxicology*, v.142-143, p.1-16, 2013.

PLUMB, J.A. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fish (Ames: Iowa State University Press), 1999.

POGORELOVA, N.P.; ZHURAVLEVA, L.A.; IBRAGIMOV, F.K.H.; IUSHCHENKO, G.V. Bacteria of the genus *Aeromonas* as the causative agents of saprophytic infection (in Russian). *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, I Immunobiologii*, v.4, p.9-12, 1995.

POSTE, A.E.; HECKY, R.E.; GUILDFORD, S.J. Evaluating microcystin exposure risk through fish consumption. *Environmental Science and Technology*, v.45, p.5806-5811, 2011.

POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*, v.352, p.21-28, 1998.

QU, F.; CUI E.B.; XIA G.M.; HE J.Y.; HONG W.; LI B., MAO Y.L. The clinical features and prognosis of *Aeromonas septicaemia* in hepatic cirrhosis: a report of 50 cases (in Chinese). *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, v.42, p.840-842, 2003.

REAL-TIME PCR APPLICATIONS GUIDE. Bio-Rad Laboratories, Inc. Bulletin 5279 p.2-3, 2006.

RHODES, M.W.; KATOR, H.; KAATTARI, I.; GAUTHIER, D.; VOGELBEIN, W.; OTTINGER, C.A. Isolation and characterization of mycobacteria from striped bass *Morone saxatilis* from the Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms*, v.61, p.41-51, 2004.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, p.40-43, 1999.

ROSS, A.J. Mycobacteriosis among pacific salmonid fishes. In: SNIESZKO, S.F. (Ed.), *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*. American Fisheries Society, Special Publication 5, Washington, DC, 1970, p.279–283.

SAĞLAM, Y. S.; ISIK, N.; ARSLAN, A.; HUDAVERDI, E.R. Erzurum bölgesindeki gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* w. 1792) *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia ruckeri* izolasyonu ve patolojik incelemeler. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, v.1, 2006.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C.; SAHOO, S.K. *Aeromonas hydrophila* versus *Edwardsiella tarda*: a pathoanatomical study in *Clarias batrachus*. Journal of the World Aquaculture Society, v.6, p.57-66, 1998.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. Science, v.230, p.1350-1354, 1985.

SAKAZAKI, R.; A proposed group of the family *Enterobacteriaceae*, the asakusa group. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.15, p.45-47, 1965.

SALAH EL-DIEN, W.M.; SAMI, E.M. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in some seafoods sold in Sharkia governorate markets and the effects of heat treatments on their viabilities. Veterinary Medicine Journal, v.11, p.121-30, 2009.

SALEH, E.A.; MORSHDY, A.E.M.A.; MOHAMED, A.M.; EL-SOBARY, B.F. Prevalence of *Aeromonas* Species and Their Herbal Control in Fish. Global Veterinaria, v.18, p. 286-293, 2017.

SHARMA, I.; KUMAR, A. Occurrence of enterotoxigenic *Aeromonas* species in foods of animal origin in North East India. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, v.15, p.883-887, 2011.

SHIINA, Y.; II K.; IWANAGA M. An *Aeromonas veronii* biovar *Sobria* infection with disseminated intravascular gas production. Journal of Infection and Chemotherapy, v.10, p.37-41, 2004.

SLAVEN, E.M.; LOPEZ, F.A.; HART, S.M.; SANDERS, C.V. Myonecrosis caused by *Edwardsiella tarda*: a case report and case series of extraintestinal *E. tarda* infections. Clinical Infectious Diseases, v.32, p.1430-1433, 2001.

SNIESZKO, S.F. Mycobacteriosis (Tuberculosis) of fishes. US Fish and Wildlife Fish Disease Leaflet, v.55, p.1-9, 1978.

SOARES, R.M.; MAGALHAES, V.,F.; AZEVEDO, S.M. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (*Cichlidae*) under laboratory conditions. Aquatic Toxicology, v.70, p.1-10, 2004.

SPENCER, J.D.; HASTINGS, M.C.; RYE, A.K.; English, B.K.; Ault, B.H. Gastroenteritis caused by *Edwardsiella tarda* in a pediatric renal transplant recipient. Pediatric Transplantation, v.12, p.238-241, 2008.

SRINIVASA RAO, P.S.; LIM, T.M.; LEUNG, K.Y. Opsonized virulent *Edwardsiella tarda* strains are able to adhere to and survive and replicate within fish phagocytes but fail to stimulate reactive oxygen intermediates. Infection and Immunology, v.69, p.5689–5697 2001.

STEITZ, A.; FEDDERSEN, A.; FREYTAG, C.; DANIELLO, S.; SCHOPF, R.E.; BÖCHER, W.O.; BHAKDI, S.; HUSMANN, M. Rapid identification of *Mycobacterium marinum* by comparative 16S-rRNA-gene analysis in five cases of progredient cutaneous infections. European Journal of Dermatology, v.7, p.295-299, 1997.

STRACHAN, T.; READ, A. Genética Molecular Humana. 2.ed. Porto Alegre: Artmed. p.576, 2002.

SVIRČEV, Z.; KRSTIĆ, S.; MILADINOV-MIKOV, M.; BALTIĆ, V.; VIDOVIĆ, M. Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews, v.27, p.36-55, 2009.

SWANN, L.A.D.; WHITE, M. R. Diagnosis and treatment of *Aeromonas hydrophila* infection of fish. Coop. Ext. Serv. (vol. AS-461, 2). Purdue University, 1991.

TACAL, J.V. JR.; MENEZ, C.F. The isolation of *Edwardsiella tarda* from a dog. The Philippine Journal of Veterinary Medicine, v.7, p.143-145, 1969.

TACQUET, A.; TISON, F.; DEVULDER, B.; ROOS, P. Techniques de recherche des mycobactéries dans le lait et les produits laitiers. *Annales De l'Institut Pasteur De Lille*, v.17, p.161-171, 1966.

TALAAT, A.M.; TRUCKSIS, M.; KANE, A.S; REIMSCHUESSEL, R. Pathogenicity of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis* to goldfish, *Carassius auratus*. *Veterinary Microbiology*, v.66, p.151-164, 1999.

THOMAS, S.; MCDURMONT, C. Isolation of acid-fast organisms from milk and oysters. *Health Laboratory Science*, v.12, p.16, 1975.

THUNE, R.L.; STANLEY. L.A.; COOPER, R.K. Pathogenesis of Gram-negative bacterial infections in warm water fish. *Annual Review of. Fish Diseases*, v.3, p.37-68, 1993.

TISON, F.; DEVULDER, B.; ROOS, P.; TACQUET, A. Techniques et resultats de la recherche des mycobactéries dans les viandes. *Annales De l'Institut Pasteur De Lille*, v.17, p.155-160, 1966.

TOXINS, Cyanobacterial. Microcystin-LR in Drinking-water. Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization 2003.

TSAI, G-J.; CHEN, T-H. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. *International Journal of Food Microbiology*, v.31, p. 121-131, 1996.

TSUJI, A., HIRASAWA, K., ARAKUMA, T., IZUMI, K., KOBORI, K., SUNOHARA, K., YOSHIZAWA, N., WATANABE, H., IZUMIYA, H. A 12-year old boy with acute gastroenteritis caused by *Edwardsiella tarda* O4:H4. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v.14, p.433-435, 2008.

VALASEK, M.A., REPA, J.J. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, v.29, p.151-159, 2005.

VAN DAMME, L.R.; VANDEPITTE, J. Isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from mammals and birds in Zaire. *Revue D'Elevage Et De Medicine Veterinaire Des Pays Tropicaux*, v.37, p.145-151, 1984.

VANDEPITTE, J.; LEMMENS, P.; DE SWERT, L. Human Edwardsiellosis traced to ornamental fish. *Journal of Clinical Microbiology*, v.17, p.165-167, 1983.

VARTIAN, C.; SEPTIMUS, E. Soft-tissue infection caused by *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila*. *The Journal of Infectious Diseases*, v.161, p.816, 1990.

VIVEKANANDHANA, G.; HATHAB, A.A.M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in fish and prawns from the seafood market of Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, v.22, p.133-137, 2005.

WHITE, F.H.; SIMPSON, C.F.; WILLIAMS, L.E. JR: Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, v.9, p.204-209, 1973.

WILSON, A.E.; GOSSIAUX, D.C.; HÖÖK, T.O.; BERRY, J.P.; LANDRUM, P.F.; DYBLE, J.; GUILDFORD, S.J. Evaluation of the human health threat associated with the hepatotoxin microcystin in the muscle and liver tissues of yellow perch (*Perca flavescens*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v.65, p.1487–1497, 2006.

WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections. In *Edwardsiella septicaemias*. 2nd edition. Edited by EVANS, J.J.; KLESIOUS, P.H.; PLUMB, J.A.; SHOEMAKER, C.A. Wallingford: CABI International; 2010, p.512-534.

WANG, I.K.; KUO, H.L.; CHEN, Y.M.; LIN, C.L.; CHANG, H.Y.; CHUANG, F.R.; LEE, M.H. Extraintestinal manifestations of *Edwardsiella tarda* infection. *International Journal of Clinical Practice*, v.59, p.917-921, 2005.

WEINBERGER, M.; BERG, S.L.; FEUERSTEIN, I.M.; PIZZO, P.A.; WITEBSKY, F.G. Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae*: report of a case and critical review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, v.14, p.1229-1239, 1992.

WHIPPS, C.M.; DOUGAN, S.T.; KENT, M.L. *Mycobacterium haemophilum* infections of zebrafish (*Danio rerio*) in research facilities. *FEMS Microbiology Letters*, v.270, p.21-26, 2007.

WILSON, A.E.; GOSSIAUX, D.C.; HOOK, T.O.; BERRY, J.P.; LANDRUM, P.F.; DYBLE, J.; GUILDFORD, S.J. Evaluation of the human health threat associated with the hepatotoxin microcystin in the muscle and liver tissues of yellow perch (*Perca flavescens*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v.65, p.1487-1497, 2007.

WODEWOTZKY, T.I. *Padronização da técnica de PCR em tempo-real na avaliação da pluripotência de células-tronco mesenquimais caninas*. 2010. 26f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado – Ciências biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.

WOLF, J.C.; SMITH, S.A. Comparative severity of experimentally induced mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis* and hybrid tilapia *Oreochromis* spp. Diseases of Aquatic Organisms, v.38, p.191-200, 1999.

WOLINSKY, E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. The American Review of Respiratory Disease, v.119, p.107-159, 1979.

WOLINSKY, E. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. Clinical Infectious Diseases. v.15, p.1-12, 1992.

WOLKE, R.E.; STROUD, R.K. Piscine Mycobacteriosis. In: MONTALI, R.J. (Ed.), Symposium on Mycobacterial Infections of Zoo Animals. Smithsonian Institution, Front Royal, VA, 1978, p.269-275.

WOOD, S.A.; BRIGGS, L.R.; SPROSEN, J.; RUCK, J.G.; WEAR, R.G.; HOLLAND, P.T.; BLOXHAM, M. Changes in concentrations of microcystins in rainbow trout, freshwater mussels, and cyanobacteria in Lakes Rotoiti and Rotoehu. Environmental Toxicology, v. 21, p.205-222, 2006.

WOODS, G.L.; WASHINGTON, J.A. II. Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. Reviews of Infectious Diseases, v.9, p.275-294, 1987.

WOOLBRIGHT, B.L.; WILLIAMS, C.D.; NI, H.; KUMER, S.C.; SCHMITT, T.; KANE, B.; JAESCHKE, H. Microcystin-LR induced liver injury in mice and in primary human hepatocytes is caused by oncotic necrosis. Toxicon, v.125, p.99-109, 2017.

WYATT, L.E.; NICKELSON II, R.; VANDERZANT, C. *Edwardsiella tarda* in freshwater catfish and their environment. Applied and Environmental Microbiology, v.38, p.710-714, 1979.

XIE, L.; XIE, P.; GUO, L.; LI, L.; MIYABARA, Y.; PARK, H.D. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. Environmental Toxicology and Chemistry, v.20, p.293-300, 2005.

XIE, L.; XIE, P.; OZAWA, K.; HONMA, T.; YOKOYAMA, A.; PARK, H-D. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. Environmental Pollution, v.127, p.431-439, 2004.

YU, S.Z. Drinking water and primary liver cancer. In: TANG, Z.Y.; WU, M.C.; XIA, S.S. (Ed.). Primary liver cancer. Berlin: China Academic Publishers, Beijing Springer Verlag, p.30-37, 1989.

YUCEL N.; CITAK, S. The occurrence, hemolytic activity and antibiotic susceptibility of motile *Aeromonas* spp. isolated from meat and milk samples in Turkey. Journal of Food Safety, v.23, p.189-200, 2003.

XANTHOPOULOS, V.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Occurrence and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in minimally processed fresh vegetable salads. Food Control, v.21, p.393-398, 2010.

XIE, L.; YOKOYAMA, A.; NAKAMURA, K.; PARK, H. Accumulation of microcystins in various organs of the freshwater snail *Sinotaia histrica* and three fishes in a temperate lake, the eutrophic Lake Suwa, Japan. Toxicon, 49, p.646-652, 2007.

YAJKO, D.M.; CHIN, D.P.; GONZALEZ, P.C. *Mycobacterium avium* complex in water, food and soil samples from the environment of HIV infected individuals. Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology, v.9, p.176-182, 1995.

YODER, S.; ARGUETA, C.; HOLTZMAN, A.; ARONSON, T.; BERLIN, O.G.; TOMASEK, P.; GLOVER, N.; FROMAN, S.; STELMA, G.JR. PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.2650-2653, 1999.

YOSHIZAWA, S.; MATSUSHIMA, R.; WATANABE, M.F.; HARADA, K.; ICHIHARA, A.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. Inhibition of protein phosphatases by microcystis and nodularin associated with hepatotoxicity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v.116, p.609-614, 1990.

YU, S. Drinking water and primary liver cancer. *Primary Liver Cancer*, p.30-37, 1989.

ZHAN, L.; SAKAMOTO, H.; SAKURABA, M.; WU DE S.; ZHANG, L.S.; SUZUKI, T.; HAYASHI, M.; HONMA, M. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid Tk6 cells. *Mutation Research*, v.557, p.01-06, 2004.

ZHANG D.; XIE P.; CHEN, J. Effects of temperature on the stability of microcystins in muscle of fish and its consequences for food safety. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.84, p.202-207, 2010.

ZHOU, L.; YU, H.; CHEN, K. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomedical and Environmental Sciences*, v.15, p.166-171, 2002.

ZIMBA, P.V.; GRIMM, C.C. A synoptic survey of musty/ muddy odor metabolites and microcystin toxin occurrence and concentration in southeastern USA channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque) production ponds. *Aquaculture*, v.218, p.81-87, 2003.

ZIMBA, P.V.; KHOO, L.; GAUNT, P.S.; BRITTAIN, S.; CARMICHAEL, W.W. Confirmation of catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), mortality from *Microcystis* toxins. *Journal of Fish Diseases*, v.24, p.41-47, 2001.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

O trabalho científico apresentado a seguir será submetido à revista “Aquaculture” (ISSN: 0044-8486). As informações referentes às normas para publicação estão disponíveis no site: <https://www.elsevier.com/journals/aquaculture/0044-8486/guide-for-authors>.

Molecular detection of mycobacteria in fillets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) available for human consumption

Bruno G. Eberhardt ^{a,b}, Marianna V. Rodrigues ^a, João P. Araújo Jr ^c, Helio Langoni ^{a*}

^a Department of Veterinary Hygiene and Public Health, Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – UNESP, Botucatu, Brazil

^b Ministry of Agriculture, Livestock and Supply – MAPA, Brazil

^c Department of Microbiology and Immunology, Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – UNESP, Botucatu, Brazil

* Address correspondence to: hlangoni@fmvz.unesp.br (H. Langoni).

50 fillets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) obtained from a fish market in a municipality in Sao Paulo State were analyzed for prevalence of *Mycobacterium* spp. Fillets were packed and identified in individual hermetic sterile plastic bags, deposited in a thermal box and transported to laboratory. Muscle samples (20 mg) were obtained and evaluated by standard PCR. The results demonstrated the presence of *Mycobacterium* spp in 100% of samples (50/50). Sequencing revealed *Mycobacterium gordonae* in all samples. Despite most of studies describe this species as non-pathogenic, there have been reports of clinically significant disease caused by *M. gordonae* in immunosuppressed patients, in the lungs, soft tissues, cornea, peritoneal cavity and, less frequently, disseminated disease and bacteremia. Thus, the considerably high numbers of this organism verified in the present study in a popular food like tilapia fillet arise concern. The change in dietary habits of population, with increased consumption of raw fish, must be a focus of attention of both food industry and government, since in most cases there are no suggestive macroscopic lesions in products. In addition, it is necessary to assess the potential role of *Mycobacterium gordonae* as an infectious agent when ingested through food, both in immunosuppressed and immunocompetent persons.

Key-words:

Mycobacterium spp, *Mycobacterium gordonae*, Aquaculture, Bacteriosis

1. Introduction

Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are present in all types of natural environments such as soil, water and aerosols, as well as in potable water distribution systems throughout the world as persistent residents of the microbiota (Falkinham, 1996). Currently, these organisms have received attention as potential causative agents of infections in humans (Van Ingen, 2015). They can affect a wide variety of animals, including peccaries; several species of mycobacteria cause diseases in fish, reptiles and amphibians, and three species are most commonly associated with diseases in fish: *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* (Gauthier & Rhodes, 2009).

However, in recent years, a wide range of *Mycobacterium* spp have been isolated from fish, supplanting the paradigm that *M. marinum*, *M. fortuitum*, and *M. chelonae* are the only agents responsible for mycobacteriosis in fish (Gauthier & Rhodes, 2009). This include *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. neoaurum*, *M. shottsii*, *M. pseudoshottsii*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae* and others, showing that mycobacteriosis are among the most common diseases in both commercial and wild fish worldwide (Gauthier & Rhodes, 2009; Mrlík et al., 2012).

In humans, the occurrence of mycobacteriosis is usually associated with aquatic activity such as swimming, fishing, navigation or aquarism (Collins et al., 1985). Several other forms of transmission were reported, among them, handling of aquariums or tanks with contaminated fish, captive dolphin bites, fish-fin and boat engine handling wounds, and others (Collins et al., 1985; Bragg et al., 1990).

NTM can be transmitted to humans from the environment, including by food. Bacteria of this genus have been isolated from beef, pork and lamb (Tison et al., 1966), dairy products (Yajko et al., 1995), water (Fischer et al., 1991), vegetables, fruits, herbs (Yoder et al., 1999), oysters (Thomas & McDermont, 1975) and fish (Arakawa et al., 1986; Chinabut et al., 1990).

Among NTM, *M. gordonae* is present in all types of environments as the third most frequent *Mycobacterium* spp after *Mycobacterium tuberculosis* and the *Mycobacterium avium* complex (Woods & Washington, 1987). However, surprisingly, this bacterium is responsible for few significant infections in humans, considered of low pathogenic potential (Woods & Washington, 1987).

M. gordonae is commonly found in water as a normally non-pathogenic colonizing agent which, when recovered in culture, is considered to be clinically insignificant or a contaminant (Eckburg et al., 2000). Reports of infections in humans are usually associated with immunodeficient patients and involve lungs, soft tissues, cornea and peritoneal cavity (Chan et al., 1984; Carcaba et al., 1989; Barber et al., 1991; Garcia-Forcada et al., 1991; Weinberger et al., 1992). Less frequently, *M. gordonae* can cause disseminated disease and bacteremia (Chan et al., 1984; Bernard et al., 1992; Bonnet et al., 1996).

Regarding the fact that most of bacteria responsible for foodborne diseases do not cause any macroscopic changes in fish fillets, making it difficult to detect them by traditional methods of inspection; the low availability of data from national surveys concerning the prevalence of pathogenic bacteria in fish and; the importance of Nile tilapia in the international economy; the aim of the present study was to verify the prevalence of *Mycobacterium* spp. in fillets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) available for human consumption.

2. Material and methods

2.1. Sampling

Considering the endemic and / or unknown nature of most diseases of aquatic animals in Brazil, the prevalence used was 10%, in a discretionary manner, as recommended by the Ministry of Fisheries and Aquaculture (MPA, 2013).

The "EpiTools" tool ("freeware") of the company "AusVet Animal Health Services" was used to calculate the sampling, in which it is possible to determine the size of the sampling in order to identify the presence of diseases using pooled samples (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=PPFreedom>). A 95% confidence interval was selected for the study of proportion. With these data, in order to achieve reliable results, a minimum of 32 samples would be necessary, but since prevalence is unknown and can vary according to pathogen, 50 samples were collected in order to obtain a greater safety margin for interpretation of the results.

The material obtained did not have information (labeling) that allowed to characterize its origin in a precise way. Thus, 50 frozen fillets of Nile tilapia (*O. niloticus*) were collected in a single collection, in the form of convenience sampling, in a fish market in a Sao Paulo State municipality. The fillets were then packed, identified in individual hermetic sterile plastic bags and stored in a thermal box with ice to preserve the temperature during transport to the laboratory.

2.2. DNA extraction

For DNA extraction, 20 mg of the musculature of each fillet were weighed. The samples were then subjected to extraction using the Relia Prep™ gDNA Tissue kit (Promega™), according to the manufacturer's recommendations. Afterwards, the samples were quantified and evaluated for their purity in the Nanodrop 2000™ spectrophotometer at 260/280 and 260/230 ratios. The DNA obtained was maintained at -20° C.

2.3. Molecular tests

Conventional PCR technique was used for *Mycobacterium* spp DNA search, since this methodology allows the subsequent sequencing to confirm the species.

2.3.1. *Mycobacterium* spp.

For the detection and identification of *Mycobacterium* spp, a pair of primers that recognize several species of this bacterium that affect fish, humans and that also can be found in the environment, were selected (Chen et al., 2013). Thus, the authors designed the primers for the 16S ribosomal region, which is conserved for these microorganisms. Therefore, for the PCR reaction, a mix of 5.3 µL of water free of nucleic acids, 10 µL of GoTaq Green 1x (Promega™), 0.6 µL of the primer Myc16SrRNAF (10 pmol / µL), 0.6 µL of the primer Myc16SrRNAR (10 pmol / µL), 0.5 µL of DMSO and 3 µL of extracted DNA, were used. Nucleic acid free water and a sample of naturally infected Nile tilapia were used as negative and positive control, respectively.

PCR was undertaken according to Chen et al. (2013), that is, initial denaturation at 94° C for 5 minutes, followed by 40 cycles at 94° C for 1 minute, 50° C for 1 minute, 72° C for 1 minute and final extension at 72° C for 6 minutes. The amplification was visualized by 1.5% agarose gel under ultraviolet light.

2.4. Sequencing

Amplified samples for *Mycobacterium* spp. were purified through the Machery-Nagel™ PCR Clean-up, Gel Extraction kit, following the manufacturer's recommendations for confirmation of the pathogen. The purity ratio (260/280 and 260/230) and quantification of the purified samples were undertaken by Nanodrop 2000™ spectrophotometer. Only samples with a purity ratio higher than 1.7 were accepted. Quantification was undertaken according to the ABI 3500™ sequencer manufacturer's recommendations (Applied Biosystems), which estimates the minimum concentration based on the size of the amplified product.

The purified and quantified samples were submitted to Sanger sequencing using the ABI Big Dye Terminator Chemistry kit (Applied Biosystems™), followed by capillary electrophoresis (Applied Biosystems, ABI 3500™). The quality of the electropherograms was assessed by Sequencing Analysis software version 5.4, aligned in ClustalW in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis program version 5.1. Sequences were identified from Genbank using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), using the program Geneious 7.0.6.

2.5. Statistical analysis

The present work is a descriptive study related to detection of *Mycobacterium* spp. with importance in Public Health. Thus, data were evaluated according to their prevalence.

3. Results

Samples of Nile tilapia fillets analyzed did not show macroscopic alterations suggestive of infectious or parasitic processes.

Regarding the application of PCR technique for *Mycobacterium* spp., all samples were positive, amplifying a product of 240 bp, expected size for this microorganism. Sanger sequencing confirmed *Mycobacterium gordonae* (93% identity) in all samples (accession number: MF472702).

4. Discussion

Few studies available in the literature have been aimed at investigating the occurrence of mycobacteria in samples of ready-to-eat Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from clinically healthy fish populations. Most of the studies involved fish populations that showed clinical signs of mycobacteriosis from aquaculture and fish incubators (Teska et al., 1997; Sanders & Swaim, 2001; Antychowicz et al., 2003).

121 The present study aimed to analyze fillets obtained from healthy individuals of Nile tilapia destined for human
 122 consumption. Of these, 100% were positive for *Mycobacterium gordonae*. This data may be related in part to the breeding
 123 system to which this species of fish is commonly submitted, that is, in tanks with high population density. High density fish
 124 populations on farms lead to loss of water quality, with increased organic pollution, leading to a higher occurrence of
 125 mycobacteria. This factor was associated with the frequent occurrence of several species of mycobacteria in freshwater
 126 aquariums and breeding tanks (Pattyn et al., 1971; Beran et al., 2006; Tsai et al., 2007). According to Falkinham III (2016),
 127 mycobacterial adaptation may occur due to resistance to anaerobic conditions. The gradual reduction in oxygen
 128 concentration in cultures does not affect the survival of these organisms, because of their ability to enter a latency stage
 129 (Dick et al., 1998).

130 The persistence of mycobacteria in various human-created environments (eg, potable water distribution systems)
 131 is due to a number of factors, including their ability to live in environments with very low levels of nutrients, their nutritional
 132 diversity, biofilm formation and resistance to disinfectants. The use of disinfectants in drinking water systems or the
 133 introduction of hydrocarbon pollutants into soils and water seems to act as selective agents, leading to the proliferation and
 134 final dominance of mycobacteria in these habitats. It is likely that human activities (such as disinfection and pollution) are
 135 causing selection of mycobacteria, at a time when aging populations and increasing prevalence of immunodeficient
 136 individuals will predispose more individuals to infection and disease (Falkinham III, 2016).

137 According to Mrlik et al. (2012), breeding sites with high population density of fish act as organically polluted
 138 environments where an abundant number of mycobacteria containing a wide range of species of this genus are expected.
 139 In the same study, the researchers isolated at least six species of mycobacteria from pond water (*M. gordonae*, *M. chimaera*,
 140 *M. intracellulare*, *M. kumamotoense*, *M. montefiorensis* e *M. nebraskense*).

141 Pavlik & Falkinham (2009) propose that the route of contamination of fish by such mycobacteria may be due to
 142 leaching, since such bacteria are also present in the soil and thus would be carried to the breeding ponds. Once in the
 143 ponds, they would come in contact with fish through gills and skin.

144 According to Eckburg et al. (2000), *M. gordonae* is commonly found in water, being considered a colonizer
 145 normally nonpathogenic to humans, which, when recovered in culture, is considered clinically insignificant or a contaminant
 146 and it is generally difficult to distinguish colonization from infection, since the bacteria is found in all types of environments.
 147 However, several case reports indicate the occurrence of infections, which are usually associated with immunodeficient
 148 patients and involve the lungs, soft tissues, cornea and peritoneal cavity (Garcia-Forcada et al., 1991; Weinberger et al.,
 149 1992), causing, to a lesser extent, disseminated disease and bacteremia (Chan et al., 1984; Berbard et al., 1992; Bonnet
 150 et al., 1996). Risk factors for colonization of the respiratory tract or lung disease by *M. gordonae* have not been defined so
 151 far. Abnormal lung architecture and host immunity may play important roles in the development of the disease caused by
 152 this species of mycobacteria (Weinberger et al., 1992).

153 Although most of reported cases of infection have occurred in immunocompromised patients, several studies have
 154 demonstrated infection in immunocompetent patients, most associated with lung diseases, including pulmonary infection
 155 (Mazumder et al., 2010), pulmonary nodule, necrotic granulomatous pneumonia (Asija et al., 2011) and pulmonary disease
 156 (Albayrak et al., 2012; Adzic-Vukicevic et al., 2018).

157 In Brazil, official fish controls and their products involve the analysis of indicators of freshness, control of histamine
 158 (in forming species), biotoxins and parasites (Brasil, 2017). However, due to the fact that most bacterial pathogens do not
 159 cause any macroscopic changes in fish fillets, their detection by traditional methods of inspection becomes impractical.
 160 Regarding this, it is impossible to ignore the growth and development of Brazilian aquaculture, and the importance of this
 161 activity as a source of food. However, growth, without the application of good practices, can momentarily increase
 162 productivity in the sector; however, the risk of disease also increases (de Perez, 2017).

163 Most diseases of aquatic animals in Brazil are endemic and / or unknown (MPA, 2013). Despite a number of
 164 diseases caused by bacteria and viruses have been registered, the knowledge of these agents is still restricted. Some may
 165 even be mandatory reporting diseases (de Perez, 2017).

166 Due to the evidence of *M. gordonae* as a possible infectious agent in humans, additional studies are necessary
 167 to assess the real risk presented by this pathogen when ingested by food in both immunosuppressed and immunocompetent
 168 persons. Consideration should be given to the changing dietary habits of the population, with different forms of preparation
 169 and consumption of fish, including raw fish, exposing the consumer to this risk.

170 Referências

- 171
 172
 173 Adzic-Vukicevic, T., Barac, A., Blanka-Protic, A., Laban-Lazovic, M., Lukovic, B., Skodric-Trifunovic, V., Rubino, S. 2018. Clinical features of infection
 174 caused by non-tuberculous mycobacteria: 7 years' experience. *Infection*, p.1-7.
 175
 176 Albayrak, N., Simşek, H., Sezen, F., Arslantürk, A., Tarhan, G., Ceyhan, I. 2012. Evaluation of the distribution of non-tuberculous mycobacteria strains
 177 isolated in National Tuberculosis Reference Laboratory in 2009-2010, Turkey. *Mikrobiyoloji Bülteni*, v.46, p.560-567.
 178
 179 Antychowicz J., Lipiec, M., Matusiewicz J. 2003. Infection of African catfish (*Clarias gariepinus*) in an intensive culture facility with *Mycobacterium*
 180 *marinum*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 23, 60–66.
 181
 182 Arakawa, C.K., Fryer, J.L., Sanders, J.E. 1986. Serology of *Mycobacterium chelonae* isolated from salmonid fish. *J. Fish Dis.* 9, 269–271.
 183
 184 Asija, A., Prasad, A., Eskridge, E. 2011. Disseminated *Mycobacterium gordonae* infection in an immunocompetent host. *American Journal of*
 185 *Therapeutics*, v.18, p.75-77.
 186
 187 Barber, T.W., Craven, D.E., Farber, H.W. 1991. *Mycobacterium gordonae*: a possible opportunistic respiratory tract pathogen in patients with advanced
 188 human immunodeficiency virus, type 1 infection. *Chest.* 100, 716–720.

- 189
190 Beran, V., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Pavlik I. 2006. Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium
191 environment. *J. Fish Dis.* 29, 383–393.
192
- 193 Bernard, E., Michiels, J.F., Pinier, Y., Bourdet, J.F., Dellamonica, P.1992. Disseminated infection as a result of *Mycobacterium gordonae* in an AIDS
194 patient. *AIDS.* 6, 1217–1218.
195
- 196 Bonnet, E., Massip, P., Bauriand, R., Alric, L., Auvergnat, J.C.1996. Disseminated *Mycobacterium gordonae* in a patient infected with human
197 immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 23, 644–645.
198
- 199 Bragg, R.R., Huchzermeyer, H.F.A.K., Hanisch, M.A.M. 1990. *Mycobacterium fortuitum* isolated from three species of fish in South Africa. *Onderstepoort*
200 *J. Vet. Res.* 57, 101-102.
201
- 202 MPA. 2013. Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico de Enfermidades de Animais Aquáticos na Rede Nacional de Laboratórios do
203 Ministério da Pesca e Aquicultura – RENAQUA. Ministério da Pesca e Aquicultura, Brasil. Disponível em:
204 <http://www.adepara.pa.gov.br/sites/default/files/MANUAL%20PARA%20COLETA%20E%20REMESSA%20PARA%20AN%C3%81LISE%20LABORATORIAL.pdf>
205
206
- 207 Carcaba, V., Carton, L.A., Fernandez Leon, A., De Diego, I.1989. Peritonitis por *Mycobacterium gordonae* en un paciente infectado por el virus de la
208 inmunodeficiencia humana. *Med. Clin. (Barc).* 93, 598.
209
- 210 Chan, J., Kitrick, L.C., Klein, R.S. 1984. *Mycobacterium gordonae* in the acquired immunodeficiency syndrome [letter]. *Ann. Intern. Med.* 101, 400.
211
- 212 Chen, J.M., Zhang, M., Rybniker, J., Boy-Röttger, S., Dhar, N., Pojer, F., Cole, S.T. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* EspB binds phospholipids and
mediates EsxA-independent virulence. *Mol. Microbiol.* 89, 1154-1166.
- 213
214 Chinabut, S., Limsuwan, C., Chanratchakool, P.1990. Mycobacteriosis in the snakehead, *Channa striatus* (Fowler). *J. Fish Dis.* 13, 531–535.
215
- 216 Collins, C.H., Grange, J.M., Noble, W.C. Yates, M.D. 1985. *Mycobacterium marinum* infections in man. *J. Hyg.* 94, 135-149.
217
- 218 De Perez, A.C.A.2017. Importância do Médico Veterinário na sanidade aquícola. *Revista CFMV.* 75, 8-11.
219
- 220 Dick, T., Lee, B.H., Murugasu-Oei, B. 1998. Oxygen depletion induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 159–164.
221
- 222 Eckburg, P.B., Buadu, E.O., Stark, P., Sarinas, P.S.A., Chitkara, R.K., Kuschner, W.G. 2000. Clinical and chest radiographic findings among persons
with sputum culture positive for *Mycobacterium gordonae*: a review of 19 cases. *Chest.* 117, 96-102.
- 223
224 Falkinham III, J.O.2016. Physiological Ecology of Environmental Saprophytic and Potentially Pathogenic Mycobacteria. In: *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health* (ed. by Kazda, J., Pavlik, I., Falkinham III, J.O., Hruska, K.), pp. 81-87. Springer, Heidelberg.
225
- 226 Falkinham III, J.O.1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 177-215.
227
- 228 Fischecher, R., Schulze-R.R., Weber, A.1991. Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. *Zentbl. Hyg. Umweltmed.* 192, 154-158.
229
- 230 Garcia-Forcada, A., Garces, J.M., Berges, A.1991. Infeccion pulmonar por *Mycobacterium gordonae* y pneumonia por *Pneumocystis carinii* en un
231 paciente afecto de síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Med. Clin. (Barc).* 96, 518-519.
232
- 233 Gauthier, D.T., Rhodes, M.W. 2009. Mycobacteriosis in fishes: a review. *Vet. J.* 180, 33–47.
234
- 235 Mazumder, S.A., Hicks, A., Norwood, J. 2010. *Mycobacterium gordonae* pulmonary infection in an immunocompetent adult. *North American Journal of*
236 *Medical Sciences*, v.2, p.205-207.
237
- 238 Mrlík, V., Slány, M., Kubečka, J., Seda, J., Necas, A., Babak, V., Slana, I., Kriz, P., Pavlik, I. 2012. A low prevalence of mycobacteria in freshwater fish from
239 water reservoirs, ponds and farms. *J. Fish Dis.* 35, 497-504.
240
- 241 Pattyn, S.R., Portaels, F., Boivin, A., Vand Den Breen, L. 1971. Mycobacteria isolated from the aquaria of the Antwerp Zoo. *Acta Zool. Pathol. Antwerp.*
242 52, 65–72.
243
- 244 Pavlik, I., Falkinham III, J.O. 2009. Water as a habitat and vector for transmission. In: *The Ecology of Mycobacteria: The Ecology of Mycobacteria: Impact*
245 *on Animal's and Human's Health* (ed. by Kazda, J., Pavlik, I., Falkinham III, J.O., Hruska, K.), pp. 95–108. Springer, Heidelberg.
246
- 247 RIISPOA. 2017. Regulamento de inspeção Industrial e sanitária de produtos de origem animal. Decreto 9.013, de 29/03/2017. Ministério da Agricultura,
248 Pecuária e Abastecimento, Brasil, 2017.
249
- 250 Sanders, G.E., Swaim, L.E. 2001. Atypical mycobacteriosis in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comp. Med.* 51, 171–175.
251
- 252 Teska, J.D., Twerdok, L.E., Beaman, J., Curry, M.1997. Isolation of *Mycobacterium abscessus* from Japanese medaka. *J. Aquat. Anim. Health.* 9, 234–
253 238.
254
- 255 Thomas, S., McDurmont, C. 1975. Isolation of acid-fast organisms from milk and oysters. *Health Lab. Sci.* 12, 16.
256
- 257 Tison, F., Devulder, B., Roos, P., Tacquet, A.1966. Techniques et resultats de la recherche des mycobactéries dans les viandes. *Ann. Inst. Pasteur de*
258 *Lille.* 17, 155–160.
259
- 260 Tsai, H.-Ch., Kunin, C.M., Lee, S.S.J., Chen, Y.-S., Wann, S.-R., Liu, Y.-W., Liu, Y.-Ch. 2007. Fish gambler's tenosynovitis caused by *Mycobacterium*
261 *marinum*: environmental investigation of a fishing pond in Southern Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59, 227–230.
262
- 263 Van Ingen. J. 2015. Treatment of pulmonary disease caused by non-tuberculous mycobacteria. *Lancet Respir. Med.* 3, 179-180.
264
- 265 Weinberger, M., Berg, S.L., Feuerstein, I.M., Pizzo, P.A., Witebsky, F.G.1992. Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae*: report of a case
266 and critical review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 14, 1229–1239.
267
- 268 Woods, G.L., Washington II, J.A.1987. Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. *Rev. Infect.*
Dis. 9, 275-294.
- 269
270 Yajko, D.M., Chin, D.P., Gonzalez, P.C.1995. *Mycobacterium avium* complex in water, food and soil samples from the environment of HIV infected
271 individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 9, 176–182.
272
- 273 Yoder, S., Argueta, C., Holtzman, A., Aronson, T., Berlin, O.G., Tomasek, P., Glover, N., Froman, S., Stelma, G.Jr. 1999. PCR comparison of
Mycobacterium avium isolates obtained from patients and foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2650–2653.

Apêndice

Extração de DNA

A extração dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) é o primeiro passo para a realização da maioria das metodologias de biologia molecular. Pode-se obter DNA a partir de inúmeros tipos de tecidos e células, e existe uma infinidade de protocolos para realização de tal procedimento. A escolha do protocolo de extração de DNA dependerá de diversos fatores como: tipo de tecido a ser utilizado, grau de pureza e de integridade necessária para a aplicação em que o DNA será utilizado (PCR, sequenciamento, clonagem gênica, etc.) (BARTLETT e STIRLING, 2003).

Normalmente, os componentes da solução extratora variam de acordo com o protocolo utilizado, sendo que cada solução deve conter um tampão para estabilizar o pH, um sal para dissociar as proteínas, um detergente para solubilizar as membranas e um agente inativante das DNAses, cuja função é proteger o DNA genômico (COSTA e MOURA, 2001).

A extração do DNA consiste, basicamente, em duas etapas. A primeira etapa é a extração propriamente dita, a partir do rompimento das membranas celulares (e consequente exteriorização do DNA). A segunda fase consiste na purificação do DNA em solução, ou seja, “retirada” dos outros componentes celulares da solução (restos de membrana, proteínas, RNA) (ROMANO, 1999).

A metodologia para se executar tais etapas pode ser resumida da seguinte forma:

- 1) Etapa de lise** – o primeiro passo consiste em realizar a lise (quebra) da célula, a fim de expor o DNA. O processo geralmente é realizado com auxílio de detergentes e enzimas, como a proteinase K;
- 2) Etapa de ligação** – uma membrana de sílica retém e concentra o DNA, por ligação seletiva com esta molécula;
- 3) Etapa de lavagem** – visa quebrar e emulsionar gorduras e proteínas que formam a membrana da célula. O processo geralmente é feito utilizando-se soluções detergentes e por centrifugação. A etapa de lavagem remove os resíduos contaminantes, obtendo-se então, apenas a membrana com o DNA;
- 4) Etapa de eluição** – por fim ocorre a liberação dos ácidos nucleicos (DNA/ RNA) da membrana (DOYLE, 1996). Obtêm-se assim o DNA purificado, pronto para ser utilizado em diferentes aplicações (Figura 15).

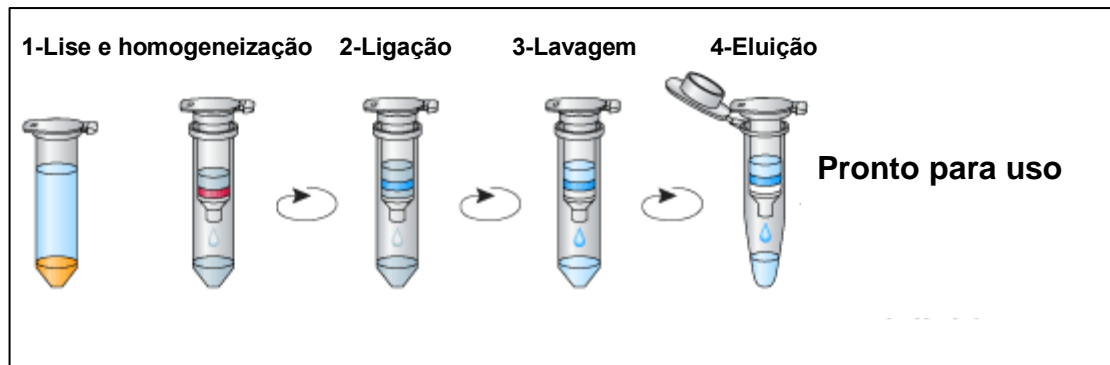


FIGURA 22. Esquema mostrando o processo básico de extração de DNA. Fonte: <http://www.clontech.com/XA/Support/Applications>.

Reação em Cadeia da Polimerase

O desenvolvimento da técnica de amplificação dos ácidos nucleicos utilizando a PCR abriu grandes perspectivas para a detecção de vários agentes etiológicos. O método permitiu amplificar *in vitro* uma determinada região do DNA em milhões de vezes e em poucas horas, utilizando-se basicamente uma reação enzimática catalisada pela Taq DNA polimerase (enzima termoestável) cuja atividade depende de ions Mg^{++} . O resultado da amplificação pode ser visibilizado em gel de agarose. A especificidade da reação é determinada pela escolha adequada de "*primers*" ou iniciadores (segmentos de DNA), que são pequenos fragmentos sintetizados e que complementam a sequência do fragmento do DNA a ser amplificado (SAIKI et al., 1985).

Primer ou iniciador refere-se a uma sequência de oligonucleotídeos, escrita sempre na direção $5' \rightarrow 3'$, que marca as extremidades da sequência de DNA alvo que se pretende sintetizar. Para tal, são necessários dois *primers*: um complementar à sequência de DNA *anti-sense* (*primer sense – forward*); e outro complementar à sequência de DNA *sense* (*primer anti-sense – reverse*). Os *primers* são adicionados ao DNA-molde desnaturado, ocorrendo assim a ligação específica às sequências de DNA complementares ao sítio-alvo, flanqueando e delimitando a região a ser analisada. Na presença de uma concentração adequada da DNA-polimerase termoestável e dos quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), é iniciada a síntese de novas fitas de DNA, que são complementares a cada uma das fitas de DNA do segmento-alvo (STRACHAN et al., 2002).

A amplificação ocorre durante repetidos ciclos de temperatura. Primeiramente, deve ocorrer a desnaturação do DNA, geralmente à temperatura de 94°C . A segunda etapa do processo consiste no anelamento dos *primers*, ou seja, na hibridização dos oligonucleotídeos às sequências-alvo em uma temperatura que varia entre 45°C e 60°C .

Finalmente, à temperatura de 72°C, ocorre a extensão dos *primers* com a utilização dos quatro dNTPs da reação, ou seja, a síntese do DNA (MOLINA e TOBO, 2004). Desta maneira, um fragmento de DNA com sequência idêntica à da sequência alvo a ser analisada é formada por várias vezes consecutivas, tornando-a majoritária na amostra. O DNA amplificado pode ser separado e visualizado em géis de agarose ou poliacrilamida com o auxílio da técnica de eletroforese (MOLINA e TOBO, 2004).

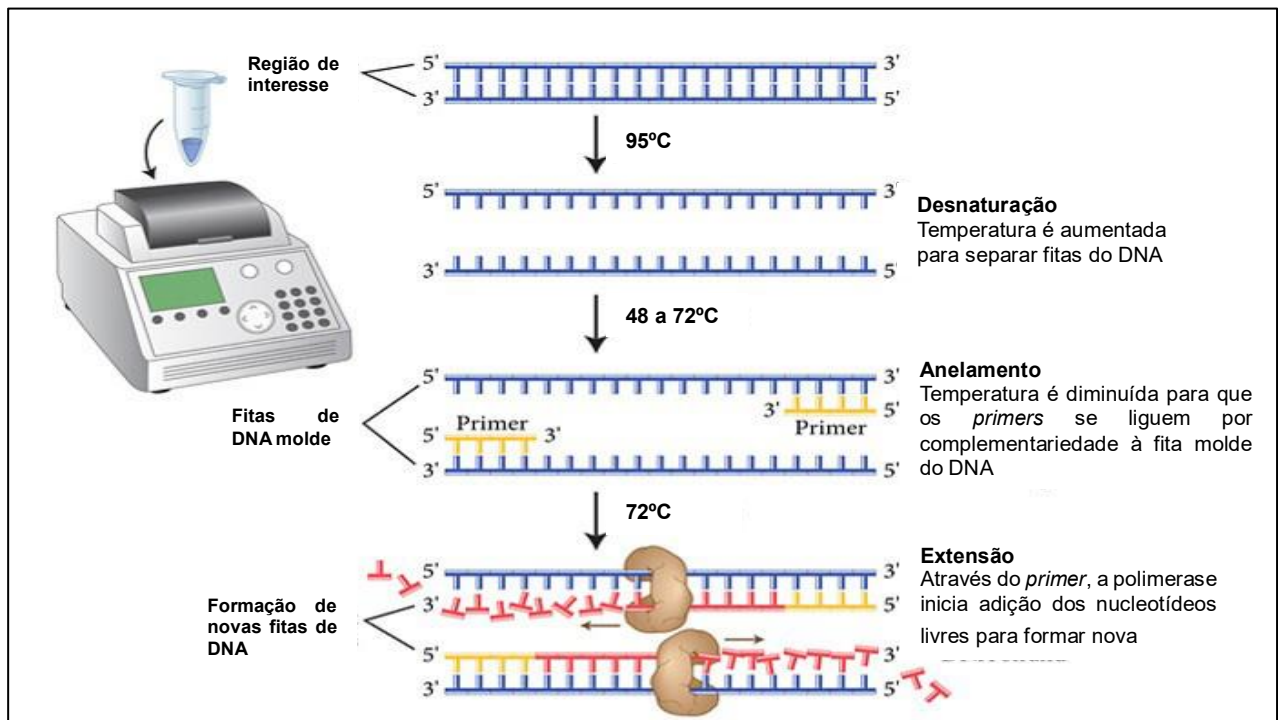


FIGURA 23. Sequência de PCR. Fonte: <http://scienceblogs.com.br/synbiobrasil/tag/pcr>.

A eletroforese em gel é uma técnica de separação de moléculas que envolve a migração de partículas em um determinado gel durante a aplicação de diferença de potencial. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, na qual as de menor massa irão migrar mais rapidamente que as de maior massa. Moléculas com carga negativa migram para o polo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva migram para o polo negativo (cátodo). Em razão das proteínas serem substâncias capazes de adquirirem carga positiva ou negativa em função do pH, é indispensável manter constante o pH do meio durante a eletroforese, pelo uso de soluções-tampão (EMBRAPA, 2001).

A partir da ampla variedade de estratégias de separação de proteínas disponível, a eletroforese tornou-se o primeiro princípio explorado para separação de fragmentos de DNA e RNA. A migração eletroforética de ácidos nucléicos é amplamente empregada em técnicas de biologia molecular, para separar, isolar e manipular fragmentos de DNA/RNA (EMBRAPA, 2001).

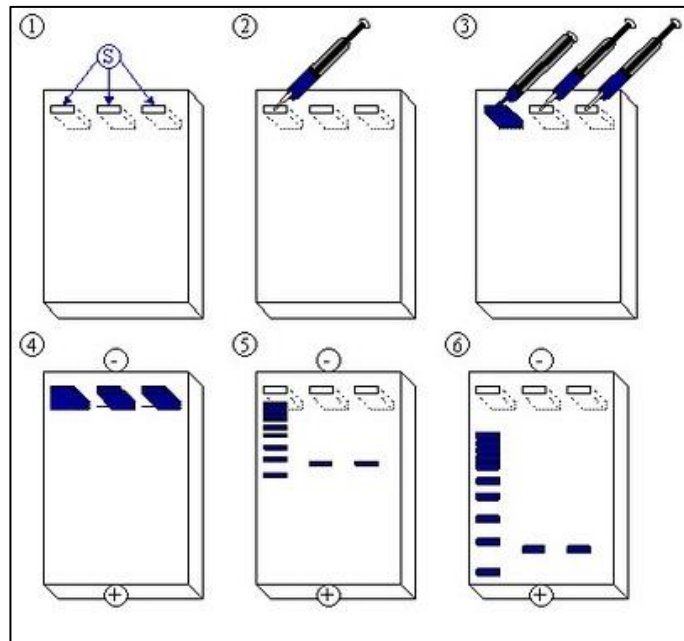


FIGURA 24. Esquematisação da técnica de eletroforese: 1 - Gel; 2 - Aplicação do marcador; 3 - Aplicação das amostras; 4 - Indução de corrente elétrica; 5 - Deslocamento e separação dos fragmentos; 6-Eletroforese realizada. Fonte: <http://www.biowiki.com.br/doku.php?id=eletroforese>.

PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

No PCR convencional, o produto amplificado, chamado de amplicon, é determinado pela análise final, onde o DNA migra por meio de um gel de agarose após a reação ser finalizada. Em contraste, o PCR em tempo real permite que o acúmulo de produto amplificado seja detectado e mensurado à medida que a reação ocorre, ou seja, em tempo real. A detecção dos produtos da PCR em tempo real é possível pela inclusão de uma molécula fluorescente na reação, a qual mostra um aumento nas quantidades de DNA proporcional ao aumento do sinal fluorescente. À medida que os ciclos da reação de PCR vão se sucedendo, ocorre o aumento do número de fluoróforos livres e consequentemente, a fluorescência é gerada (BIO-RAD LABORATORIES, 2006).

A emissão de fluorescência pode ser feita pelos sistemas TaqMan® e SYBR Green®. No primeiro, uma sonda fluorescente hibridiza na região-alvo que vai ser amplificada pelo *primer sense*. A sonda possui fluoróforo ligado na extremidade 5' (*reporter* = R), e um composto que bloqueia a emissão desta fluorescência (*quencher* = Q). Assim que o *primer sense* inicia a extensão, a DNA polimerase cliva o *reporter* e a fluorescência é emitida a cada ciclo de amplificação. Desta forma, a reação de amplificação é diretamente proporcional à fluorescência emitida. No sistema SYBR Green®, os fluoróforos presentes ligam-se em toda a dupla fita de DNA formada, emitindo

fluorescência. No processo de desnaturação da dupla fita, a fluorescência é dramaticamente reduzida. Durante a extensão das novas fitas, no processo de polimerização da DNA polimerase, os fluoróforos se ligam às duplas fitas em formação, resultando na emissão de fluorescência (Figura 18). A fluorescência gerada reflete a quantidade de produto amplificado em cada ciclo (VALASEK e REPA, 2005).

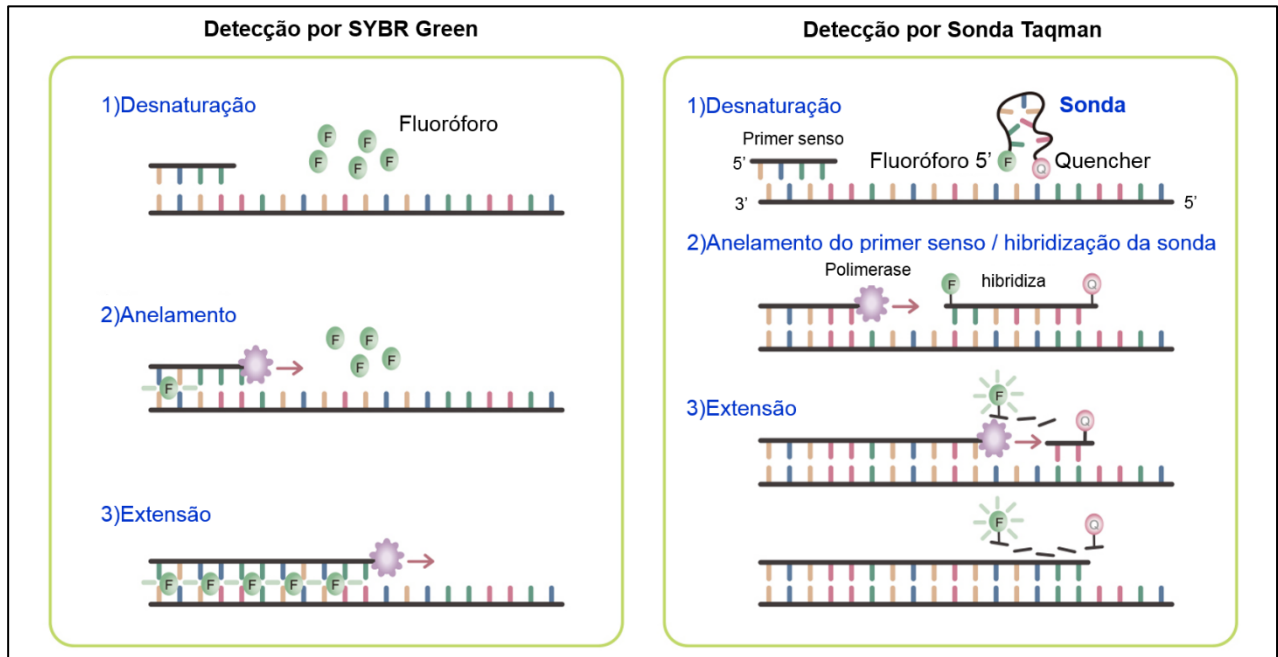


FIGURA 25. Esquema mostrando os diferentes sistemas de adição de fluoróforos. Fonte: <http://genomictree.com/en/microarray-ngs-service>.

Os resultados dos PCR em tempo real podem ser qualitativos (presença ou ausência de uma sequência) ou quantitativos (número de cópias de DNA). Adicionalmente, os dados de PCR em tempo real podem ser avaliados sem a necessidade de gel de eletroforese, resultando em maior agilidade na obtenção dos resultados. Ainda, pelo fato da reação e dos dados serem avaliados dentro de um sistema fechado, as chances de contaminação são reduzidas e a necessidade de manipulação pós-amplificação é eliminada. Assim, em comparação com o PCR convencional, o qPCR em tempo real possui características vantajosas como maior rapidez, especificidade, sensibilidade e realização da quantificação do produto amplificado (BIO-RAD LABORATORIES, 2006).

A curva de amplificação é composta por três fases: uma fase exponencial seguida por uma fase linear e finalmente, uma fase não exponencial, chamada platô. Durante a fase exponencial, a quantidade de produtos de PCR aproximadamente dobra a cada ciclo. À medida que os ciclos da reação de PCR vão se sucedendo, ocorre o aumento do número

de fluoróforos livres e, conseqüentemente, da fluorescência gerada. Quando a fluorescência emitida pelo fluoróforo atinge a linha de limiar (*threshold*), dá-se início à fase exponencial. O ciclo em que o limiar é atingido é denominado Ct (*Threshold cycle* – nº de ciclos) e é inversamente proporcional à concentração de produto gerado da reação (WODEWOTZKY, 2010).

À medida que a reação prossegue, os componentes começam a ser consumidos até que um ou mais componentes se torne limitado. Nesse ponto, a reação diminui de velocidade e dá-se início à fase de platô (ciclos 28-40 – Figura 19).

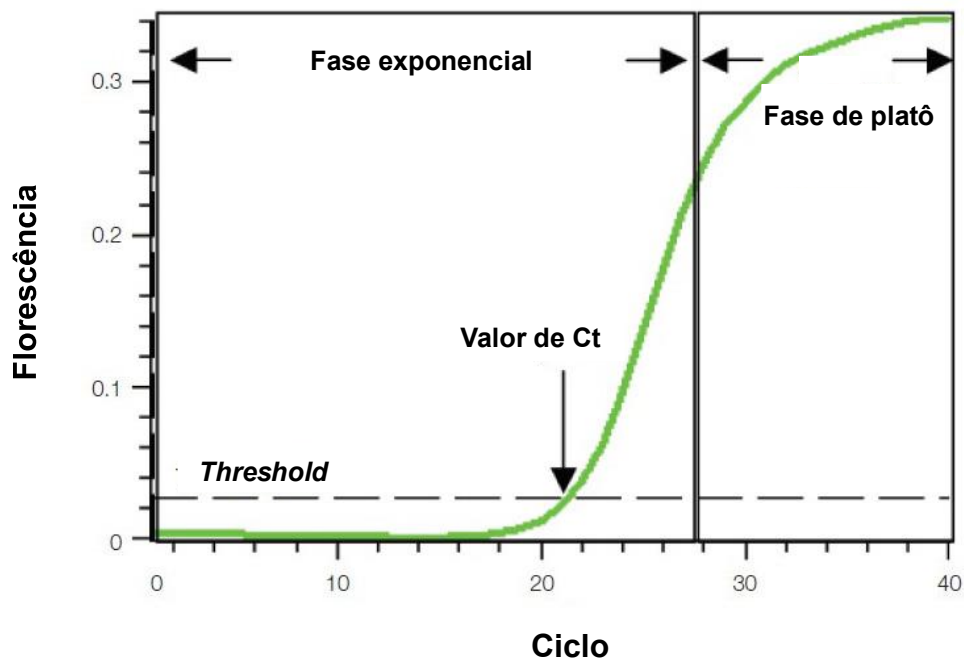


FIGURA 26. Curva de amplificação, onde a linha de fluorescência está evidenciada. Fonte: Bio-Rad Laboratories. Real-Time PCR Applications Guide, 2006).

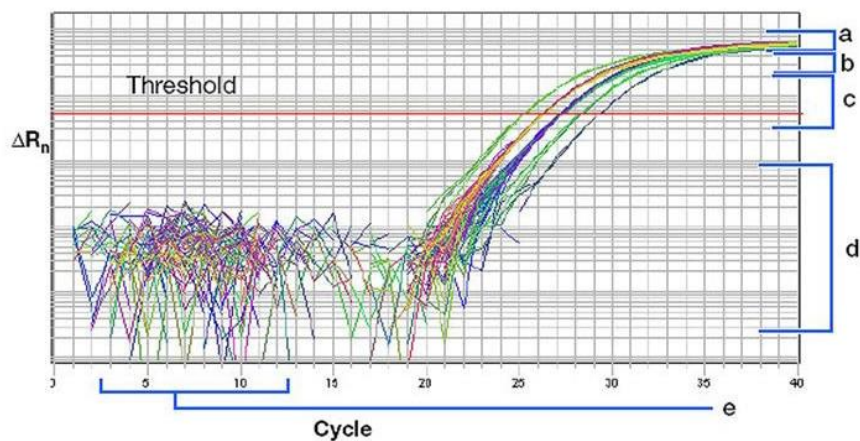


FIGURA 27. Curva de amplificação típica, visível devido à presença dos fluoróforos. (a) Fase de platô (b) Fase linear (c) Fase exponencial (d) Background. Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/10269606>.