

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Francisella noatunensis orientalis* EM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) CULTIVADAS EM TANQUES-REDE NA BACIA  
HIDROGRÁFICA DO RIO ARAGUARI – MINAS GERAIS

FERNANDA RAGHIANTE

Botucatu - São Paulo

Junho/2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Francisella noatunensis orientalis* EM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) CULTIVADAS EM TANQUES-REDE NA BACIA  
HIDROGRÁFICA DO RIO ARAGUARI – MINAS GERAIS

FERNANDA RAGHIANTE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar, como critério para obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Germano Francisco Biondi  
(Orientador)

Dr. Otávio Augusto Martins  
(Co-Orientador)

Botucatu - São Paulo

Junho/2016

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Raghianti, Fernanda.

Francisella noatunensis orientalis em tilápias  
(Oreochromis niloticus) cultivadas em tanques-rede na bacia  
hidrográfica do rio Araguari-Minas Gerais / Fernanda  
Raghianti. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Germano Francisco Biondi

Coorientador: Otávio Augusto Martins

Capes: 50505009

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Franciselose - Diagnóstico. 3.  
Francisella. 4. Bactérias. 5. Peixe - Saúde. 6. Reação em  
cadeia da polimerase.

Palavras-chave: Diagnóstico; Franciselose; Sanidade  
Aquícola; qPCR.

Doutoranda: Fernanda Raghianti

Título: *Francisella noatunensis orientalis* em tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em tanques-rede na bacia hidrográfica do rio Araguari – Minas Gerais

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Dr. Otávio Augusto Martins

Presidente e Co-orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu – SP

---

Prof. Dr. Luiz Carlos de Souza

Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu – SP

---

Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues

Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu - SP

---

Prof. Dr. Noé Ribeiro da Silva  
Titular  
Universidade Federal de Uberlândia  
Diretor de ensino, Pesquisa e Extensão da Fundação de Excelência Rural de  
Uberlândia

---

Prof. Dr. Edson José Fragiorge  
Titular  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Do Triângulo Mineiro –  
Campus Uberlândia.

Prof. Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim  
Suplente  
Unidade Técnica Regional de Agricultura  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Botucatu – SP.

Dra. Anee Valéria Mendonça Stachissini  
Suplente  
Unidade Técnica Regional de Agricultura  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Botucatu – SP.

Dra. Marianna Vaz Rodrigues  
Suplente  
Departamento de Medicina Veterinária  
Universidade Paulista – UNIP – Bauru – SP.

Data de defesa: 07 de junho de 2016.

*Dedico esse trabalho aos meus amados filhos,  
Enrico e Lorenzo. É por vocês que vivo...é  
por vocês que cheguei até aqui!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar o caminho nas horas incertas.

Ao meu amado esposo, Rodrigo, meu especial agradecimento pelo carinho e amor com que sempre cuida da nossa família, em especial na minha ausência; pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos, estando ao meu lado e me dando força do início ao fim desse nosso trabalho.

Aos meus filhos, Enrico e Lorenzo, que à sua maneira compreenderam e aceitaram a minha ausência, me acompanharam nas vezes que moramos em Botucatu e se adaptaram de forma surpreendente a uma nova rotina, a um novo clima, sem nunca questionarem, apenas me fazendo sorrir.

Aos meus pais, Lourival e Fátima, meus agradecimentos por todo apoio e incentivo durante toda minha vida, e sobretudo, nos momentos mais difíceis nos últimos três anos, suprimindo minhas necessidades e ausências junto aos meus filhos e permitindo que me dedicasse à finalização do meu trabalho.

Ao professor e orientador Dr. Germano Francisco Biondi, pela amizade, confiança e por mais uma vez abrir as portas da UNESP para que eu pudesse me aperfeiçoar e continuar crescendo em minha profissão.

Ao meu amigo e co-orientador, Dr. Otávio Augusto Martins, pelo apoio e valiosa contribuição nos momentos finais dessa trajetória. Exemplo de ética, caráter e sabedoria que levarei sempre comigo, junto à minha profissão. A você, nossa (minha e de minha família) eterna gratidão!

Ao Professor Dr. João Pessoa Araújo Júnior do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP que possibilitou o suporte financeiro à execução do projeto junto ao Laboratório do Instituto de Biotecnologia – UNESP.

Ao diretor executivo, Professor Dr. Celso Luis Marino, do Instituto de Biotecnologia – UNESP – *Campus* de Botucatu que permitiu gentilmente a utilização dos laboratórios para a execução do projeto.

À Dra. Marianna Vaz Rodrigues, pela fundamental contribuição na execução do projeto, pelos valiosos ensinamentos e por humildemente compartilhar de seus conhecimentos de forma memorável.

Aos colegas da Pós-graduação, em especial a Marina de Mattos Ferrasso e seu namorado João Pedro, pela amizade e pela imensurável ajuda e suporte em diversos momentos no final dessa trajetória.

Ao meu grande amigo Aguinaldo Marques (Pena) e sua amável esposa, Vera, pelo carinho e apoio em todos os momentos que estive em Botucatu. Levarei sua amizade comigo por toda vida!

Aos meus amigos Elaine Alves dos Santos e Rodrigo Faria Sousa Pereira pela amizade sincera e pela disposição em ajudar, sem medirem esforços.

## LISTA DE TABELAS

## Página

TABELA 1. <i>Primers</i> utilizados para pesquisa de <i>Francisella noatunensis orientalis</i> .....	34
TABELA 2. Média $\pm$ erro padrão da massa corpórea (g) e do comprimento (cm) de <i>Oreochromis niloticus</i> machos e fêmeas. Análise estatística complementado com o Teste Kramer-Tukey ( $p < 0,05$ ).....	36
TABELA 3. Associação entre a presença de <i>Francisella</i> spp. e sexo e comprimento das tilápias ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) analisadas .....	38
TABELA 4. Porcentagem (%) da lesão macroscópica e da confirmação laboratorial da presença de <i>Francisella</i> spp. pela qPCR em baço de tilápias machos e fêmeas.....	38
TABELA 5. Valores de <i>threshold cycle</i> e temperatura de <i>melting</i> das amostras positivas e dos controles positivo e negativo para <i>Francisella</i> spp. realizado pela qPCR.....	39
TABELA 6. Distribuição e prevalência de amostras de baço de <i>Oreochromis niloticus</i> positivas para <i>Francisella</i> spp. pelo método de qPCR nos frigoríficos da região da bacia hidrográfica do rio Araguari, Minas Gerais, Brasil .....	40

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. <i>Oreochromis niloticus</i> .....	5
FIGURA 2. <i>Tilapia rendalli</i> .....	6
FIGURA 3. <i>Oreochromis aureus</i> .....	7
FIGURA 4. <i>Oreochromis urolepis hornorum</i> .....	7
FIGURA 5. <i>Oreochromis mossambicus</i> .....	8
FIGURA 6. Tanques escavados.....	10
FIGURA 7. Tanque escavado com proteção contra predadores naturais.....	10
FIGURA 8. Tanque-rede.....	12
FIGURA 10: Baço de tilápia com lesões sugestivas de <i>Francisella</i> spp.....	17
FIGURA 11: Baço hipertrofiado com lesões granulomatosas.....	17
FIGURA 12. Alterações em tecidos de tilápias experimentalmente infectadas com <i>Francisella noatunensis orientalis</i> . (A). Granuloma (g) em na porção anterior de rim com predominância de macrófagos epitelióides pálidos e vacuolizados. Granulomas com núcleos escurecidos representam dissociação de linfócitos. (B) Granuloma (g) na porção posterior com túbulos renais deslocados periféricamente (setas).....	18
FIGURA 13. Representação esquemática das fases da qPCR. ■ = amostra com DNA alvo; ◆ = amostra controle; Rn = intensidade do sinal fluorescente; (a) linear; (b) exponencial inicial; (c) logarítmica linear; (d) platô.....	24
FIGURA 14. Representação esquemática da variação linear de amplificação conforme o número de cópias de DNA obtidas pela qPCR.....	25
FIGURA 15. Vista da bacia hidrográfica do Rio Araguari na mesorregião do Triângulo Mineiro, a uma distância aproximada de 207,07 Km.....	32
FIGURA 16. Porcentagem (%) de lesões observadas nas tilápias ( <i>Oreochromis niloticus</i> ), presentes nos frigoríficos A, B e C, localizados na bacia hidrográfica do rio Araguari, Minas Gerais, Brasil .....	37
FIGURA 17. Ponto de amplificação das 6 amostras positivas de baço de tilápias na qPCR para <i>Francisella</i> spp. em comparação com o controle positivo <i>Francisella noatunensis orientalis</i> . .....	39
FIGURA 18. Curva de <i>Melting</i> para as 6 amostras positivas de baço de tilápias comparadas ao controle positivo <i>Francisella noatunensis orientalis</i> . ....	40

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1: Tese

	<b>Página</b>
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUÇÃO .....	3
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
1.1 Espécies de tilápias .....	5
1.2 Situação do cultivo de tilápias no Brasil .....	9
1.3 Sistemas de cultivo .....	9
1.3.1 Tanques escavados .....	9
1.3.2 Tanques-rede .....	11
1.4 <i>Francisella</i> spp .....	14
1.4.1 Patogenia .....	16
1.4.2 Sinais clínicos .....	18
1.4.3 Epidemiologia .....	19
1.4.4 Diagnóstico .....	21
1.4.4.1 PCR .....	22
1.4.4.2 qPCR .....	23
1.4.4.3 Sequenciamento .....	26
1.5 Prevenção e controle da franciselose .....	27
1.6 Produção .....	30
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1 Número de amostras .....	31
3.2 Amostras .....	32
3.3 Identificação de <i>Francisella</i> spp por qPCR .....	33
3.3.1 Extração de DNA .....	33

	<b>Página</b>
3.3.2 qPCR.....	34
3.4 Sequenciamento.....	35
3.5 Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	36
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÃO.....	45
7. REFERÊNCIAS.....	45

## **CAPÍTULO 2: Artigos Científicos**

Journal of Fish Diseases: Authors Guidelines.....	67
Artigo: Prevalence of <i>Francisella</i> spp. in <i>Oreochromis niloticus</i> cultivated in cages system.....	80
Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: Normas para publicação.....	104
Artigo: <i>Francisella</i> spp. em tilápias no Brasil: uma revisão.....	112
Hepatomegalia e esplenomegalia em <i>Oreochromis niloticus</i> cultivadas em sistema de tanques-rede.....	132

## **CAPÍTULO 1: TESE**

*Francisella noatunensis orientalis* EM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) CULTIVADAS EM TANQUES-REDE NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO ARAGUARI – MINAS GERAIS

## RESUMO

A franciselose em peixes podem causar sérias perdas econômicas aos produtores. Os objetivos dessa pesquisa foram estimar e identificar a prevalência de *Francisella noatunensis orientalis* em *Oreochromis niloticus* cultivadas em tanques-rede na bacia hidrográfica do rio Araguari – Minas Gerais – Brasil. Foram coletadas aleatoriamente 150 amostras de baço de *Oreochromis niloticus* oriundas de cultivos em tanques-rede localizados em reservatórios de hidrelétricas localizadas na bacia hidrográfica do rio Araguari - Minas Gerais, Brasil e abatidas em três frigoríficos distintos. Foram mensurados o comprimento padrão (cm) e a massa corpórea (g) dos peixes. Antes da coleta do baço, foi identificado o sexo dos peixes. O baço foi utilizado para identificar a *Francisella* spp. pelo método de qPCR. As fêmeas apresentaram uma massa corpórea e um comprimento padrão menores significativamente ( $p < 0,0001$ ) quando comparados com os machos. Não foi observada relação significativa entre essas variáveis com a presença da bactéria ( $p > 0,05$ ). Os resultados da qPCR identificaram a *Francisella* spp. em seis amostras, correspondendo a prevalência de 4 %. Dessas, duas foram encaminhadas para a realização do sequenciamento do gene *igC* pertencente à região 16S do RNA ribossômico, o qual identificou a presença de *Francisella noatunensis orientalis* em ambas. Esse achado de prevalência pode levar à instauração, por parte dos órgãos governamentais, de condutas de vigilância dos casos de franciselose no país, devido às importantes perdas econômicas geradas por seu agente etiológico.

**Palavras-chave:** franciselose, diagnóstico, qPCR, sanidade aquícola.

## ABSTRACT

Francisellosis in fishes can cause serious economic losses to producers. The aims of this research were to estimate and verify the prevalence of *Francisella noatunensis orientalis* in *Oreochromis niloticus* grown in cages system in Araguari river hydrographic basin – Minas Gerais state – Brazil. It was collected, randomly, 150 spleen samples of *Oreochromis niloticus* derived crops in cages located in hydroelectric reservoirs placed in Araguari river hydrographic basin – Minas Gerais state – Brazil, from three different slaughterhouses. It was measured the fishes standard length (cm) and the body mass (g). Before the collection of the spleen, the gender of the fishes was identified. The spleen was used to identify the *Francisella* spp. by qPCR method. The female showed a body mass and significantly smaller standard length ( $p < 0,0001$ ) when compared with males. It was not observed a significant relationship between these variables with the presence of bacterium ( $p > 0,05$ ). The qPCR results identified *Francisella* spp. in six samples, representing a prevalence of 4 %. From these, two were directed to the achievement of the sequencing of the gene *iglC* belonging to the 16S ribosomal RNA identified the presence of *Francisella noatunensis orientalis* on both. This prevalence finding may lead to the establishment, from government departments, monitoring behavior of francisellosis cases in Brazil, due to major economic losses generated by its etiological agent.

**Key words:** francisellosis, diagnosis, qPCR, aquaculture health.

## INTRODUÇÃO

A aquicultura, uma arte milenar de origem asiática, é traduzida na atualidade como a atividade do setor primário mais promissora a atender a deficiência de nutrição da população global. Isso se deve não apenas ao fato de fornecer proteína animal de qualidade, mas também por ser uma forma de reduzir a pobreza pela geração de oportunidades de trabalho para pessoas de baixa qualificação profissional nos ambientes rurais e urbanos (ROCHA; RODRIGUES, 2015).

Nas últimas cinco décadas, a produção global de peixes provenientes tanto de pesca extrativa quanto da aquicultura tem aumentado, sendo a China o maior produtor mundial de pescado (FAO, 2014). Nesse contexto, o Brasil ocupa o 17º lugar no *ranking* em aquicultura e a 25ª posição na pesca extrativista (BRASIL, 2010). Em relação apenas à produção continental, o Brasil encontra-se em 9º lugar, chegando a produzir 388.700 toneladas, equivalente a 0,9 % da produção total, enquanto que a China é líder absoluta com uma produção de 24.817.311 toneladas, o que corresponde a 60,1 % da produção de peixes mundial em continente (FAO, 2015a).

O Brasil possui um relevante potencial para o desenvolvimento da aquicultura em suas diversas regiões, cada qual com sua especificidade produtiva. Nos parques aquícolas continentais brasileiros os peixes mais cultivados são: tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (BRASIL, 2016).

O Estado de Minas Gerais é o segundo maior produtor de tilápias da região sudeste, atrás apenas do estado de São Paulo (BRASIL, 2011). Na região do Triângulo Mineiro - Minas Gerais - Brasil, não há estimativa do volume de produção de tilápias, uma vez que 90 % dos piscicultores atuam na ilegalidade (BRASIL, 2016). Essa falta de fiscalização gera desinformação referente a possíveis patógenos que podem estar presentes nesses cultivos.

O pescado ainda não ocupa papel de destaque da produção de proteína animal no Brasil. O consumo de peixes recomendado pela OMS é de 12 quilogramas/habitante/ano sendo que a população brasileira consome 14,5

enquanto o consumo *per capita* mundial é de 19,2 quilogramas/habitante/ano (FAO, 2014; BRASIL, 2015a).

A tilápia do Nilo é a principal espécie cultivada no Brasil, devido principalmente à sua precocidade, fácil adaptação a diversos tipos de ambiente e sistemas de criação, excelentes taxas de crescimento e ótima aceitação pelo consumidor (TAVARES; PALHARES, 2011; KUBITZA et al., 2012). Além disso, a carne de tilápia é muito apreciada, por ser saborosa, com baixo teor de gordura (0,9 %) e de calorias (172 Kcal/100 g de carne). Outra vantagem é o fato desse peixe apresentar um rendimento de filé em torno de 30 % a 40 %, o que o torna bastante interessante para industrialização (NOGUEIRA; RODRIGUES, 2007).

A espécie *O. niloticus* apresenta um bom desempenho em sistemas intensivos de produção e vem se adaptando com sucesso a cultivos em tanques-rede (FURLANETO et al., 2006). Esse sistema de criação de peixes tem sido uma ótima alternativa para aproveitamento dos ambientes aquáticos inexplorados, dispensando o desmatamento e evitando problemas com erosão e assoreamento (CARDOSO et al., 2005).

Um dos grandes entraves da aquicultura é a densidade populacional em relação à área de criação, pois propicia maiores concentrações de matéria orgânica, desenvolvimento de algas e outros micro-organismos que causam impacto ambiental e nos animais. A criação em tanques-rede favorece a alta densidade, gerando estresse nos peixes, tornando-os aptos ao desenvolvimento de diversas infecções. Dentre os patógenos de maior ocorrência em piscicultura, destacam-se as bactérias que causam grandes prejuízos econômicos e sanitários (BARTON, 2002; ELLIS et al., 2002; NORTH et al., 2006).

Nesse contexto, as bactérias pertencentes do gênero *Francisella* tem sido muito estudadas devido a sua característica emergente. Nesse gênero, destaca-se a espécie *Francisella noatunensis orientalis*, responsável por perdas econômicas na produção de peixes. Essa espécie é responsável por causar principalmente granulomas multifocais em órgãos internos como baço, rins e fígado (SOTO et al., 2009a, 2012), levando a sérios prejuízos econômicos aos produtores (LIMA, 2007).

A identificação das bacterioses em peixes é realizada através da verificação dos sinais clínicos, isolamento de bactérias, técnicas bioquímicas e moleculares, como por exemplo, reação em cadeia da polimerase (PCR), em

especial a PCR em tempo real (qPCR), seguidas de métodos baseados em análises de sequenciamento da subunidade ribossomal 16S RNAr (JANDA; ABBOTT, 2007).

Medidas de prevenção e tratamento no cultivo de tilápias devem ser adotadas na tentativa de diminuir os riscos eminentes ofertados por esse micro-organismo. Para tal, o diagnóstico laboratorial e o manejo adequado são fundamentais para a manutenção da sanidade do plantel.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Espécies de tilápias

A tilapicultura é originária da Ásia, há mais de quatro mil anos. Seu expressivo crescimento nas últimas três décadas tem feito desse grupo de peixes um dos mais cultivados de forma extensiva no mundo. Nesse âmbito, a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Figura 1) é a principal espécie cultivada (EL-SAYED, 2006; SOTO et al., 2014).



**FIGURA 1.** *Oreochromis niloticus* (Fonte: STIASNY, 2003).

A chegada da tilápia ao Brasil, data da década de 1950, quando a espécie *Tilapia rendalli* (Boulenger, 1897) (Figura 2) foi importada de Élisabethville (Congo Belga), atual República Democrática do Congo – África (GURGEL,

1998), para povoamento dos reservatórios hidrelétricos da empresa “Light” no Estado de São Paulo. Em 1971, o Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) introduziu essa espécie com o objetivo de povoamento dos reservatórios da região nordeste (OLIVEIRA et al., 2007; BARROSO et al., 2015).



**FIGURA 2.** *Tilapia rendalli* (Fonte: NICO et al., 2016a).

Nesse momento da história da introdução da tilápia no Brasil alguns entraves foram identificados. A baixa taxa de crescimento de *T. rendalli* e a alta prolificidade e consanguinidade de *O. niloticus* causou a disseminação descontrolada da tilápia nos reservatórios brasileiros tendo como resultado baixos índices de produtividade (OLIVEIRA et al., 2007). A partir daí outras espécies foram sendo trazidas da África, dentre elas *Oreochromis aureus* – tilápia azul (Steindachner, 1864) (Figura 3), *Oreochromis urolepis hornorum* – tilápia de Zanzibar (Trewavas, 1966) (Figura 4) e *Oreochromis mossambicus* – tilápia de Moçambique (Peters, 1852) (Figura 5) com o objetivo de repovoamento para práticas de pesca artesanal e segurança alimentar (BARROSO et al., 2015).



**FIGURA 3.** *Oreochromis aureus* (Fonte: NICO et al., 2016b).



**FIGURA 4.** *Oreochromis urolepis hornorum* (Fonte: RAZAK, 2014).



**FIGURA 5.** *Oreochromis mossambicus* (Fonte: U.S. FISH AND WILDLIFE SERVICE, 2011).

As espécies *O. niloticus*, *O. aureus*, *O. mossambicus*, e *O. urolepis hornorum* tem se destacado na aquicultura mundial devido à expressão de algumas características zootécnicas como taxa de crescimento, tolerância ao frio, tolerância à salinidade, maturação sexual e prolificidade (OLIVEIRA et al., 2007).

A tilápia é um peixe tropical com relativa resistência a variações no ambiente. Suportam bem oscilações de temperaturas, onde seu crescimento é favorecido a temperaturas entre 26°C e 28°C, sendo os valores letais abaixo de 8°C e acima de 42°C. Apresenta rusticidade em relação ao nível de oxigênio dissolvido na água, com ótimo em concentração de 3 mg L<sup>-1</sup>, suportando viver por curtos períodos de tempo em concentrações de 1 mg L<sup>-1</sup>. O potencial Hidrogeniônico (pH) ideal da água para seu cultivo é em torno de 7 e 8, suportando valores limites de 3 e 12 por um curto período. Além disso, as tilápias podem se adaptar a águas salobras, onde há grande variação em relação à salinidade no ambiente aquático (ZANIBONI-FILHO, 2004).

## *1.2 Situação do cultivo de tilápias no Brasil*

O Brasil apresenta um expressivo potencial para o desenvolvimento da aquicultura, pois comporta aproximadamente 12 % da água doce disponível no planeta. São mais de cinco milhões de hectares de lâminas d'água disponíveis em reservatórios de usinas hidrelétricas e bacias particulares e também uma extensa costa marítima, em torno de 8400 Km, passível de uso para produção em cativeiro (CREPALDI et al., 2006).

A produção da tilápia já ocorre em 1878 municípios brasileiros, sendo restrita pela legislação ambiental apenas à bacia amazônica. Nos últimos anos, o cultivo de tilápia teve um aumento médio anual entre 20 % e 25 %, em 2014 foram 198,49 mil toneladas despescadas, valor equivalente a 41,9 % do total da piscicultura do país (IBGE, 2014). Fato favorecido pela autorização por parte do governo, do uso das águas da União para fins aquícolas (BRASIL, 2004). Desse total produzido, 99 % é consumido internamente (BARROSO et al., 2015).

## *1.3 Sistemas de cultivo*

### *1.3.1 Tanques escavados*

Apesar do grande crescimento no cultivo de tilápias em tanques-rede no Brasil, grande parte da produção deste peixe vem do cultivo em tanques escavados, também chamados de viveiros (Figura 6). Esse tipo de criação impõe ao produtor alguns desafios para um manejo adequado e eficiente. O principal deles é a despesca realizada com redes de arrasto convencionais. Nesse método, peixes podem saltar por sobre a rede ou escapar por debaixo da mesma, se enfiando no lodo do tanque e dependendo do caso, até morrendo (KUBITZA, 2009).



**FIGURA 6.** Tanques escavados (Fonte: arquivo pessoal).

Devido a essa dificuldade na despesca, geralmente a engorda de tilápias cultivadas em viveiros é feita em fase única, onde os alevinos são estocados e engordados até o peso de mercado sem nenhuma intervenção. Alguns produtores optam por realizar a engorda em duas etapas: a primeira é o berçário onde os alevinos são recriados em local protegido (Figura 7) até alcançarem 10 a 100 gramas e a segunda, onde os então juvenis são engordados até atingirem o peso comercial desejado (KUBITZA, 2009).



**FIGURA 7.** Tanque escavado com proteção contra predadores naturais (Fonte: arquivo pessoal).

Outro fator relevante é a presença de sabores indesejáveis no pescado cultivado nesse sistema, conhecido como *off-flavor* (TUCKER, 2000). O ambiente límnic vem sofrendo grandes alterações ao longo dos anos, devido à urbanização e expansão das indústrias. Como consequência, ocorre a perda na qualidade da água de cultivo, o que propicia um ambiente aquático alterado, levando à produção de duas substâncias que são a principal causa do *off-flavor* nos peixes: Geosmina (GEO) e 2-metilisoborneol (MIB), compostos orgânicos responsáveis, respectivamente, pelo cheiro de terra e de bolor ou mofo na água (SOUZA et al., 2012).

Vantagens estão associadas ao cultivo de tilápias em viveiros, dentre elas a menor incidência de doenças e a maior eficiência nas conversões alimentares reduzindo o uso de ração e custo de alimentação. Para a viabilização desta última, o produtor deve investir em equipamentos e estruturas que facilitem a despesca e possibilitem a classificação dos peixes por tamanho. Além disso, as tilápias são eficientes no aproveitamento do plâncton, alimento natural disponível nos tanques. Tais fatores quando associados, podem diminuir o custo de produção em viveiros (KUBITZA, 2009).

A piscicultura é uma atividade que pode gerar significativos impactos ambientais, tanto na sua instalação quanto em sua operação. Esse problema se agrava nos cultivos em tanques escavados. Na tentativa de minimizar esse problema nesse tipo de criação, algumas práticas podem ser adotadas, como: (a) uso de ração balanceada e de forma racional, evitando sobras; (b) uso dos efluentes para fertirrigação; (c) construção de viveiros preferencialmente em áreas já degradadas; (d) redução na taxa de renovação de água; (e) uso de lagoas de decantação para tratamento de efluentes aliado à colocação de filtros; (f) praticar o policultivo para potencializar o uso do espaço e dos recursos naturais e (g) cultivar preferencialmente espécies da bacia hidrográfica onde está localizada a piscicultura (FARIA et al., 2013).

### 1.3.2 Tanques-rede

Tanques-rede são estruturas flutuantes para cultivo de peixes, constituídas por redes ou telas, em diversas formas e tamanhos, com função de reter um determinado número de indivíduos, com fluxo constante de água (Figura 8). Basicamente são estruturas constituídas de uma armação para sustentação de

telas de diâmetro entre 19 e 25 milímetros, com flutuadores e comedouros apoiados, com uma tampa, também de tela, para evitar fugas dos peixes e ataque de predadores. Sinalizadores utilizando tambores de PVC de 50 a 200 litros, na cor amarela ou luminosos, são exigidos pela Marinha em cultivos em águas da União (TANIGUCHI et al., 2014).



**FIGURA 8.** Tanque-rede (Fonte: arquivo pessoal).

O sistema de tanques-rede para o cultivo de tilápias é um dos mais utilizados atualmente e o mais produtivo por unidade de cultivo. É uma modalidade de criação intensiva que tem como principal objetivo o aumento da produtividade por área trabalhada com conseqüente ganho em lucratividade. Isso se deve ao fato do método permitir o uso múltiplo e racional dos recursos hídricos (represas, rios, lagos) que são abundantes no Brasil, dispensando o desmatamento; apresentar menor custo fixo por produção quando comparado a outros sistemas de cultivo e ainda, possibilitar produção escalonada, obtendo a colheita ao longo de todo o ano (TANIGUCHI et al., 2014).

Na implantação desse sistema, deve-se considerar algumas características relevantes aos tanques-rede para se evitar prejuízos. O material vazado deve ter diâmetro suficiente para permitir a maior troca possível de água com o ambiente e ser resistente o bastante para suportar o peso dos peixes e impedir evasões através da tela, e ainda, ser de material resistente a corrosão e que permita a remoção dos dejetos gerados pelos peixes evitando seu acúmulo dentro dos

tanques. Deve ser de custo acessível e ser capaz de possibilitar a retenção da ração dentro do tanque até que seja totalmente consumida (CYRINO; CONTE, 2006).

O cultivo de tilápias em tanques-rede facilita o monitoramento e a despesca pois nesse sistema é possível a observação frequente dos peixes, o que favorece o manejo sanitário e o controle de predadores. Porém, algumas desvantagens em seu uso são observadas, como: (a) o risco de encrustamento e rompimento da tela da gaiola com perda da produção; (b) total dependência do sistema de arrastoamento; (c) necessidade de fluxo de água constante através das redes; (d) a alta densidade gerando estresse aos animais; (e) diminuição da qualidade da água pelo acúmulo de matéria orgânica favorecendo a introdução de doenças e/ou peixes no ambiente prejudicando a população natural e (f) o acúmulo de fezes e metabólitos embaixo dos tanques-rede causando impacto ambiental (LONGHI et al., 2012).

Além disso, a criação de peixes em tanques-rede pode levar à eutrofização artificial no ambiente, devido ao acúmulo de resíduos gerados no manejo oriundos de alimentos não digeridos e metabólitos, que elevam a concentração de nitrogênio e fósforo na água, proporcionando a proliferação excessiva de algas e plantas aquáticas. Isso aliado a fatores como baixos índices pluviométricos, baixa umidade relativa do ar e altas temperaturas afetam diretamente o volume de águas nos reservatórios e conseqüentemente em sua vazão, agravando o processo de eutrofização. Dependendo da intensidade desse processo, o resultado pode ser profundas alterações no ambiente aquático comprometendo a estabilidade do ecossistema (FERREIRA et al., 2005; BARROSO et al., 2015).

A forma de cultivo mais utilizada em tanques-rede é o bifásico, onde na primeira fase, a de pré-engorda, alevinos com peso médio em torno de um grama são estocados em tanques de alevinagem até atingirem entre 20 e 30 gramas de peso. Daí, passam para a segunda fase, a de engorda, onde permanecem por cerca de 120 dias até atingirem o peso comercial que varia de 600 a 850 gramas. Nesse cultivo o ciclo total de engorda da tilápia ocorre em torno de 180 dias. Outra opção é o cultivo trifásico. A diferença para o bifásico está na primeira fase, que é dividida em duas. Os alevinos de um grama de peso ficam estocados em tanques com malha de 5 milímetros por pelo menos 21 dias, até atingirem

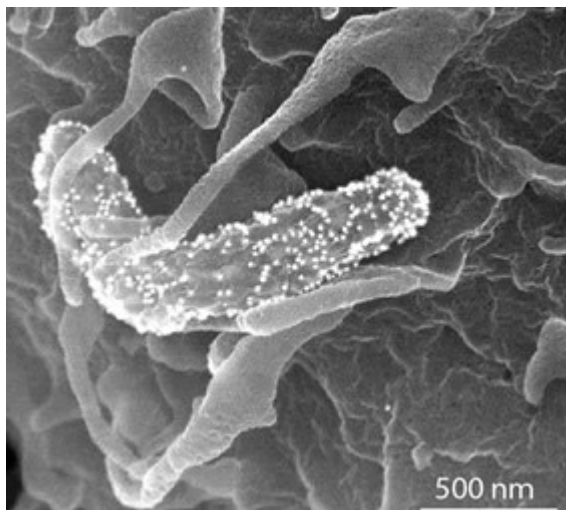
peso médio de dez gramas. Daí são transferidos para tanques com malha de 8 milímetros de diâmetro onde permanecem por 30 a 40 dias até atingirem peso superior a 20 gramas. Antes de sua transferência para os tanques de engorda, os peixes, nesse sistema, passam por classificação entre pequenos, médios e grandes e são distribuídos para outros tanques conforme seu tamanho (NOGUEIRA; RODRIGUES, 2007).

Em cultivos em tanques-rede, a densidade de tilápias varia entre 30 a 50 Kg m<sup>-3</sup> ao final de cada ciclo. As formulações de rações específicas para esse tipo de criação permitem um rápido crescimento dos peixes com uma excelente performance em um período relativamente curto de tempo, e dependendo das condições climáticas da região, é possível produzir até dois ciclos por ano (ENGLAND, 2014).

O equilíbrio entre a saúde dos peixes cultivados, proliferação de patógenos e a qualidade do ambiente aquático é essencial para o sucesso na produção em tanques-rede. Qualquer fator que desequilibre esse sistema, como por exemplo, manejo inadequado, alterações bruscas de temperatura, nutrição desequilibrada, deterioração da água; favorecem a proliferação de parasitos e de agentes patogênicos fúngicos, virais e bacterianos (ZANOLO; YAMAMURA, 2006; KUBITZA et al., 2013).

#### 1.4 *Francisella* spp.

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Francisella* foram isolados pela primeira vez em 1910, na Califórnia, nos Estados Unidos da América (EUA) e posteriormente, em 1922, descritos pelo bacteriologista americano Edward Francis (RYAN; RAY, 2004). Pertencem à família Francisellaceae, são membros do grupo das  $\gamma$ -proteobactérias e são cocobastonetes gram-negativos imóveis (Figura 9), álcool-ácido-resistentes, parasitas intracelulares, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos (SOTO et al., 2012; MARTINS et al., 2015).



**FIGURA 9.** *Francisella* spp. aderida a macrófago (Fonte: MARTINS et al., 2015).

A taxonomia do gênero *Francisella* spp. está em discussão e revisão. Atualmente, 5 espécies são reconhecidas: *F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. noatunensis*, *F. hispaniensis* e *F. haliotidica* (OTTEM et al., 2009; HUBER et al., 2010; BREVIK, et al., 2011). A espécie *F. noatunensis* compreende duas subespécies: *Francisella noatunensis noatunensis* e *Francisella noatunensis orientalis* (OTTEM et al., 2009). Ambas responsáveis por causar doença granulomatosa em peixes de água doce e marinhos (SCHRALLHAMMER et al., 2011).

O isolamento de *Francisella noatunensis* foi obtido inicialmente através do cultivo de células e posteriormente pelo cultivo em ágar coração cisteína, cuja composição inclui infusão coração de bovino (*Beef Heart Infusion*), peptona proteose, dextrose, cloreto de sódio, L-cistina, ágar, adicionado de 100 a 500 unidades de penicilina por mililitro de meio para redução de possível flora contaminante. As colônias características dessa espécie são pequenas, convexas e opacas, com crescimento ótimo a 22°C. Bioquimicamente, são catalase positivas, oxidase negativas, produtoras de ácido sulfídrico. Produzem fosfatase ácida e alcalina, esterase C4, esterase lipase C8, β-lactamase e nafitol-AS-BI-fosfohidrolase. Não produzem ácido na fermentação dos carboidratos arabinose, glicose, maltose, manitol, ribose, sorbitol, sacarose e trealose (AUSTIN; AUSTIN, 2012).

Soto et al. (2013a) cultivaram cepas de *Francisella noatunensis orientalis* em ágar coração cisteína suplementado com solução de hemoglobina bovina por 72 horas a 28°C e também, em caldo Mueller- Hinton suplementado com 0,1 % de glicose e com IsoVitaleX® (Becton Dickenson BBL, Sparks, MD, USA), um suplemento para recuperação de células injuriadas, segundo protocolo descrito por BAKER et al. (1985). O caldo foi incubado *overnight* a 25°C, no agitador a 175 rpm e depois a cultura foi acrescentada de glicerol a 20 % e congelada a -80°C para ser usada posteriormente.

Segundo Klinger-Bowen et al. (2012), bactérias do gênero *Francisella* isoladas de peixes não são reconhecidas como sendo zoonóticas, significando que estas não causam doença em humanos.

#### 1.4.1 Patogenia

Os mecanismos de patogenicidade da *Francisella noatunensis orientalis* não são totalmente conhecidos. Esses micro-organismos apresentam uma expressiva taxa de infectividade e uma notável habilidade em persistir no ambiente (SOTO et al., 2015). Em alevinos de tilápias uma contagem igual ou superior a 23 UFC g<sup>-1</sup> pode ser letal (SOTO et al., 2009b).

As lesões mais comumente encontradas em peixes acometidos por franciselose são esplenomegalia, nefromegalia, com granulomas multifocais afetando principalmente o baço e de forma menos frequente o fígado, rins, intestinos e músculo esquelético (Figuras 10 e 11) (JEFFERY et al., 2010; COLQUHOUN; DUODU, 2011; CAMUS et al., 2013). Tais lesões caracterizam-se pela grande quantidade de cocobastonetes que se acumulam nos citoplasmas celulares ocasionando vasculite necrotizante focal e difusa, resultando na formação de granuloma (MAUEL et al., 2007; SOTO et al., 2012).

Exames histopatológicos de órgãos e tecidos afetados ajudam na identificação e descrição da *Francisella*. Cortes histológicos de órgãos afetados revelam a presença de granulomas com centro de aspecto necrosado e geralmente preenchido com líquido. É possível observar ainda a presença de macrófagos, fibroblastos, leucócitos e um pequeno número de bactérias Gram negativas nesses granulomas (KUBITZA; KUBITZA, 2013).



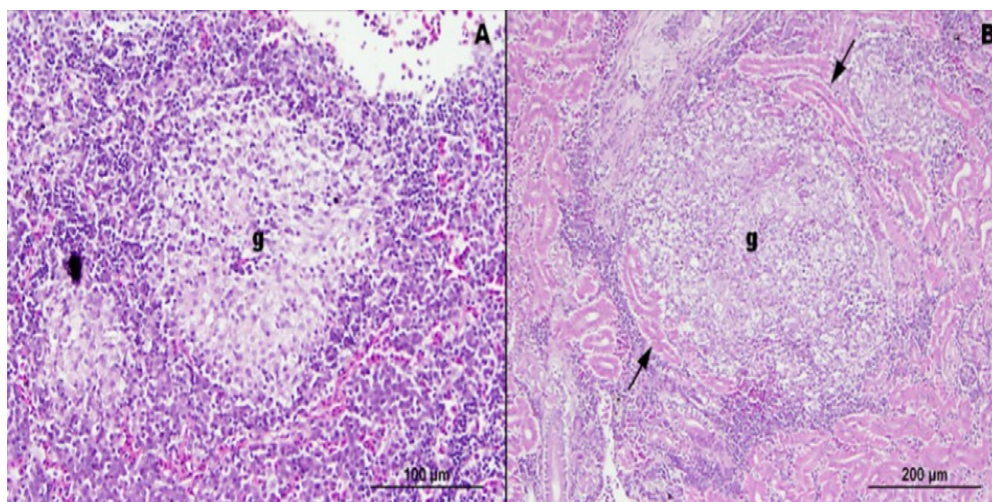
**FIGURA 10:** Baço de tilápia com lesões sugestivas de *Francisella* spp. (Fonte: FIGUEIREDO, 2015).



**FIGURA 11:** Baço hipertrofiado com lesões granulomatosas (Fonte: FIGUEIREDO, 2015).

Soto et al. (2013b), no intuito de estudar a patogenicidade da *Francisella noatunensis orientalis*, desafiaram experimentalmente alevinos de tilápias com uma cepa selvagem de *Francisella noatunensis orientalis*. E ainda, avaliaram a dispersão da bactéria através de múltiplos órgãos e verificaram a relação com as lesões. Os autores observaram lesões granulomatosas predominadas pela presença de macrófagos com vacúolos citoplasmáticos contendo pequenas bactérias cocóides (Figura 12, A e B). Achados esses consistentes com outros

descritos na literatura para franciselose (BIRCKBECK et al., 2011; COLQUHOUN; DUODU, 2011).



**FIGURA 12.** Alterações em tecidos de tilápias experimentalmente infectadas com *Francisella noatunensis orientalis*. (A) Granuloma, (g) na porção anterior do rim com predominância de macrófagos epitelióides pálidos e vacuolizados. Granulomas com núcleos escurecidos representam dissociação de linfócitos. (B) Granuloma, (g) na porção posterior com túbulos renais deslocados periféricamente (setas) (Fonte: adaptado de SOTO et al., 2013b).

Bactérias do gênero *Francisella* spp. são capazes de penetrar a pele intacta ou injuriada para induzir uma resposta inflamatória local, com formação de pápulas e úlceras *in situ*. Através de dispersão linfohematogênica, os agentes conseguem invadir o tecido parenquimal resultando na formação de granulomas e abscessos (HSIEH et al., 2006).

Klinger-Bowen et al. (2012) relataram que pode haver peixes com granulomatose em surtos de outras doenças que não a franciselose, ou seja, essa lesão por si só não confirma a presença de *Francisella* nas tilápias.

#### 1.4.2 Sinais clínicos

Nos peixes, a franciselose pode se manifestar de forma aguda, apresentando sinais clínicos discretos, porém com alta taxa de mortalidade.

Segundo Chern e Chao (1994) a mortalidade de tilápias associada a infecção natural por *Francisella* spp. pode alcançar 95 %.

A franciselose pode também se manifestar como uma infecção subaguda ou crônica, com sintomas inespecíficos tais como anorexia, natação errática, anemia e exoftalmia. Durante a necropsia também é possível observar áreas hemorrágicas focais, perda de escamas, erosão na epiderme, nefromegalia e esplenomegalia (SOTO et al., 2009 a,b; MARTINS et al., 2015).

Dentre os sinais característicos de *Francisella* destaca-se: (a) presença de granulomas de um a cinco milímetros, branco-amarelados, principalmente no rim e baço mas que podem ocorrer com menos frequência nas gônadas, fígado e coração; (b) nódulos brancos nas brânquias, semelhantes aos que ocorrem nas infecções por *Edwardsiella tarda*; (c) lesões granulomatosas na forma de pontos escurecidos na musculatura. Os sinais clínicos da franciselose podem ser semelhantes a de outras bacterioses, como por exemplo, *Edwardsiella tarda*. Sendo assim, o diagnóstico definitivo da doença deve ser realizado somente através da identificação do agente patogênico (KUBITZA; KUBITZA, 2013).

Hiperplasia epitelial pode ser observada nas brânquias e também ascite. Além disso, lesões intramusculares podem ocorrer e afetar significativamente o processamento das tilápias (BIRCKBECK et al., 2011).

### 1.4.3 Epidemiologia

A bactéria *Francisella* spp. está largamente difundida pelo mundo. Essa distribuição geográfica generalizada associada a um amplo espectro de hospedeiros e à transmissão peixe a peixe, sugerem a existência de reservatórios naturais desse micro-organismo. Nesse sentido, a previsão de surtos relacionados a franciselose é dificultada e agravada pela impossibilidade de controle efetivo por falta de informações relativas a presença ou não do agente no ambiente de cultivo (BARTHOLOMEW, 2011).

A franciselose é altamente transmissível sob condições ambientais ótimas. Nylund et al. (2006) demonstraram que a transmissão horizontal da *Francisella* spp. ocorre em bacalhau por coabitação. Esses mesmos autores sugeriram que a introdução da bactéria em fazendas de cultivo se dá através de alevinos

cultivados oriundos de ninhada selvagem ou que reservatórios naturais de *Francisella* spp. podem estar presentes na forma de amebas, peixes selvagens ou outras espécies marinhas. Outros estudos evidenciaram que a *Francisella* spp. é transmitida horizontalmente, de peixe para peixe a curtas distâncias (NYLUND et al., 2006; MIKALSEN et al., 2007).

Kubitza e Kubitza (2013) relataram a possibilidade da infecção e mortalidade causadas por *Francisella* estarem relacionadas à temperatura da água, infestações parasitárias, manejo e aumento da turbidez mineral da água. E ainda, o contato direto entre peixes sadios e infectados bem como com suas fezes, também pode ser via de infecção dentro do cultivo. *Francisella* isolada de tilápia não se desenvolve bem a temperaturas acima de 28°C e quando a água está a baixas temperaturas, o sistema imunológico das tilápias se torna enfraquecido. A associação desses fatores pode explicar o fato da franciselose ocorrer com maior frequência quando a água está entre 20°C e 25°C. Além disso, os autores também afirmaram que protozoários são potenciais reservatórios para *Francisella*, portanto, peixes com alta carga parasitária são mais susceptíveis à doença.

*Francisella noatunensis* pode estar presente em ambientes com diferentes temperaturas. Nos cultivos em climas temperados predomina a *Francisella noatunensis noatunensis*, devido à sua predileção por águas mais frias. Já em climas tropicais, onde a temperatura da água é mais elevada, há o predomínio da espécie *Francisella noatunensis orientalis* (OTTEM et al., 2009; KLINGER-BOWEN et al., 2012).

#### 1.4.4 Diagnóstico

Para o diagnóstico das doenças bacterianas em peixes, as alterações comportamentais dos animais acometidos, os sinais clínicos e a taxa de mortalidade devem ser associados ao isolamento bacteriano através de métodos microbiológicos convencionais. Nesse caso, deve-se considerar as características da doença e a peculiaridade de cada agente. Algumas bactérias são facilmente isoladas em cultivos tradicionais, já outras requerem condições mais específicas para seu crescimento, o que pode se tornar inviável pela dificuldade no isolamento (ISHIKAWA et al., 2011; TOENSHOFF et al., 2012).

Técnicas de imuno-histoquímica que permitem a marcação de bactérias associadas a avaliação histopatológica podem facilitar a identificação etiológica e dessa forma, complementar as análises microbiológicas no diagnóstico de bacterioses (ROMANO et al., 2012).

O isolamento de bactérias através de técnicas moleculares como por exemplo, reação em cadeia da polimerase (PCR), em especial a PCR em tempo real (qPCR), seguidas de sequenciamento da subunidade ribossomal 16S RNAr são os métodos mais acurados para identificação específica de bactérias (JANDA; ABBOTT, 2007). Esse fragmento do DNA genômico é conservado entre as bactérias, o que permite a identificação com alta especificidade e sensibilidade entre as espécies de micro-organismos presentes nas amostras (CLARRIDGE, 2004).

No caso específico da identificação de *Francisella* spp. isolada de peixes, autores aplicaram a técnica de qPCR seguida pelo sequenciamento da subunidade 16S do RNAr ribossomal com resultados satisfatórios na identificação de *Francisella* spp. em peixes (BIRKBECK et al., 2007; OTTEM et al., 2008; JEFFERY et al., 2010; JACOB et al., 2011; KULKARNI et al., 2011; KLINGER-BOWEN et al., 2012; SOTO et al., 2012; CAMUS et al., 2013; SOTO et al., 2013b; BRETT et al., 2014; ; LIN et al., 2015; NGUYEN et al., 2015; RUANE et al., 2015).

#### 1.4.4.1 PCR

No ano de 1988, Saiki et al. descreveram a utilização da enzima DNA (ácido desoxirribonucleico) polimerase extraída da bactéria termófila, *Thermus aquaticus* na PCR. O uso dessa enzima permitiu que a reação fosse processada em temperaturas mais altas, melhorando a especificidade da reação e aumentando o percentual de produto amplificado, permitindo a automação do processo. Além disso, a enzima DNA polimerase possibilitou a minimização da obtenção de produtos inespecíficos, bem como a amplificação de produtos maiores que 400 pares de bases, expandindo significativamente a utilização da PCR (INNIS; GELFAND, 1990; ERLICH et al., 1991).

A PCR permite que um fragmento específico da molécula de DNA seja amplificado milhares de vezes em apenas algumas horas. A técnica baseia-se

em ciclos que se repetem em três etapas que ocorrem a diferentes temperaturas, na presença de reagentes termoestáveis (dois *primers* ou iniciadores, quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados, a enzima termoestável Taq polimerase e tampão) e sequências específicas de DNA a serem amplificadas. Os *primers* são pequenos fragmentos de DNA fita simples, com orientações opostas (EISENSTEIN, 1990).

A reação envolve ciclos de temperatura e se divide em três etapas: (a) desnaturação do DNA molde em fita simples; (b) hibridização ou anelamento dos *primers* às regiões complementares no molde; (c) extensão e síntese do fragmento de DNA (FARBER, 1996).

Na etapa de desnaturação, a temperatura é elevada para 92°C a 95°C, quebrando as ligações do tipo pontes de hidrogênio que unem as fitas de DNA, desnaturando-as. A fita de DNA exposta é denominada *template* ou molde e essa se anelará a outra fita de DNA contendo a sequência iniciadora (*primers*). (SCHEINERT et al., 2005). Para que ocorra o anelamento, a temperatura da reação é reduzida rapidamente para 35°C a 60°C, dependendo do tamanho dos iniciadores utilizados. Isso permite que ocorra a hibridização DNA-DNA dos *primers* com a sequência alvo (EISENSTEIN, 1990). Em seguida, para que a enzima DNA polimerase realize a extensão no sentido 5'– 3', a temperatura é elevada para 72°C (TAYLOR et al., 1993). Este ciclo deve ser repetido dezenas de vezes e conforme os ciclos se repetem, a quantidade de DNA da sequência alvo aumenta exponencialmente e a amplificação segue uma progressão geométrica, tendo como resultado sequências de DNA homólogas ao DNA molde (TAYLOR, 1993; FARBER, 1996).

Após a obtenção do produto amplificado (*amplicons*), uma alíquota deste é aplicada em gel de agarose, submetida à eletroforese, corada com Brometo de etídio e visualizada sob luz ultravioleta. Os resultados são obtidos pela comparação entre as amostras, da presença de bandas de mesmo peso molecular. Isso aliado à sua intensidade levam a um resultado qualitativo sobre a presença do alvo amplificado (ORLANDO et al., 1998).

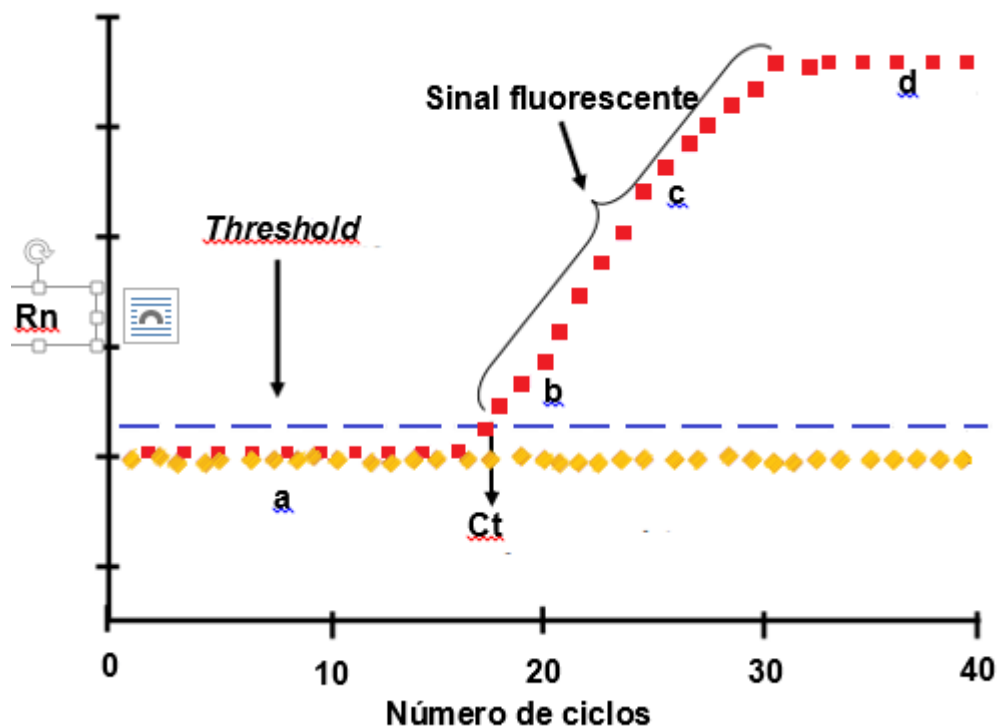
A eletroforese é uma técnica baseada na separação de partículas em um determinado gel de acordo com sua massa e carga. Macromoléculas que possuem carga elétrica são capazes de movimentar-se quando submetidas à um campo elétrico, sendo atraídos pelo polo de carga oposta. A eletroforese em gel

de agarose permite separar longos fragmentos de DNA, dependendo da concentração do gel. Geralmente se trabalha com géis de agarose de 1 % a 1,5 % dependendo do fragmento de DNA esperado. São utilizados fluoróforos como o Brometo de etídio, que se ligam ao DNA e permitem sua visualização no gel (SAMBRROK; GREEN, 2012).

#### 1.4.4.2 qPCR

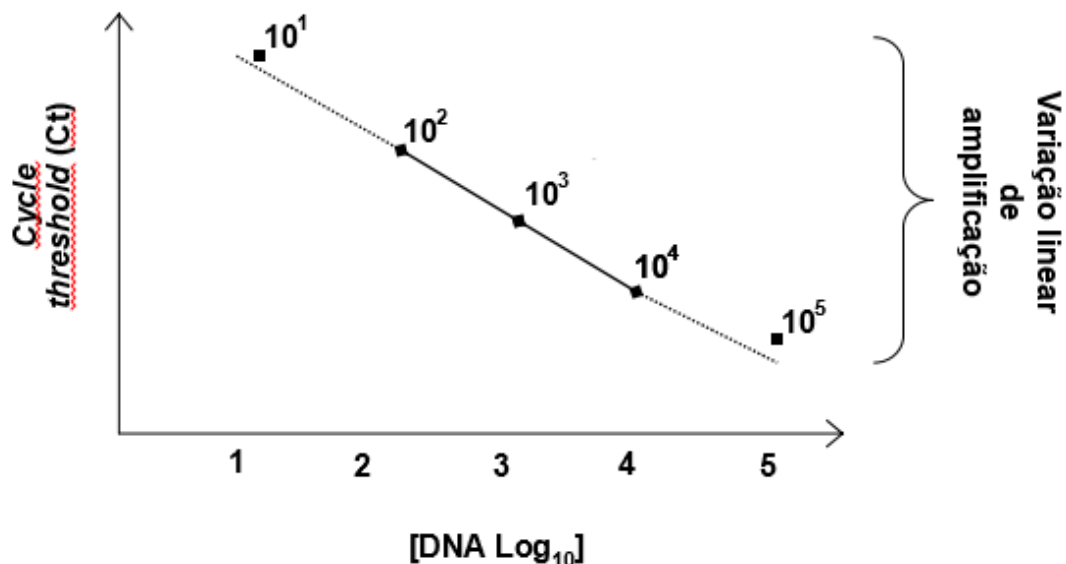
A qPCR, técnica amplamente utilizada para quantificar micro-organismos de interesse clínico e em saúde pública, foi desenvolvida inicialmente no intuito de estimar o número de cópias de um gene de interesse (DOLKEN et al., 1998). No final da década de 1990, a qPCR passou a ser utilizada para quantificar vírus em humanos (CANE et al., 1999; LEWIN et al., 1999). Uma técnica que une relevante simplicidade combinada a alta sensibilidade, especificidade e rapidez nos resultados fez da qPCR referência e uma potente ferramenta em quantificação da expressão gênica (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; BUSTIN et al., 2009).

A curva de amplificação obtida da qPCR apresenta quatro fases (Figura 13): (a) linear; (b) exponencial inicial; (c) logarítmica linear e (d) platô. Os primeiros 10 a 15 ciclos onde a emissão de fluorescência ainda não é suficiente para atingir o limiar de detecção (*threshold line*), corresponde à fase linear. O início da fase exponencial se dá quando essa emissão ultrapassa o limiar de detecção. Nesse ponto estabelece-se o ciclo de detecção (*Cycle threshold – Ct*). O aumento exponencial no sinal fluorescente corresponde a fase logarítmica linear. E quando o sinal se torna constante pela limitação dos componentes da reação, tem-se a fase platô (WONG; MEDRANO, 2005).



**FIGURA 13.** Representação esquemática das fases da qPCR. ■ = amostra com DNA alvo; ◆ = amostra controle; Rn = intensidade do sinal fluorescente; (a) linear; (b) exponencial inicial; (c) logarítmica linear; (d) platô. Adaptada de Mocellin et al. (2003).

Na reação de qPCR, os *amplicons* produzidos são marcados com moléculas fluorescentes ou corantes que se ligam ao DNA e são quantificados a cada ciclo. O Ct, parâmetro essencial a ser avaliado na qPCR, corresponde ao ciclo da reação no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha arbitrária, denominada limiar (*threshold line*) (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Em uma relação linear, o Ct é inversamente proporcional ao número de cópias do DNA alvo, ou seja, quanto maior a concentração de material genético na amostra, menor será o número de ciclos necessários para atingir o ciclo de detecção (Ct) (Figura 14) (MOCELLIN et al., 2003).



**FIGURA 14.** Representação esquemática da variação linear de amplificação conforme o número de cópias de DNA obtidas pela qPCR. Adaptada de Mocellin et al. (2003).

A identificação da amplificação na qPCR baseia-se no uso de sondas fluorescentes específicas para uma determinada região da molécula que está sendo amplificada, através do emprego de marcadores fluorescentes que se intercalam na molécula de DNA. Dentre esses, o sistema SYBR Green® é um dos mais utilizados e consiste de um corante fluorescente altamente sensível que quando ligado à fita dupla de DNA, provoca um acréscimo significativo na fluorescência, permitindo a identificação do acúmulo do produto da qPCR durante a reação. Portanto, existe uma relação diretamente proporcional entre a intensidade da fluorescência e a quantidade de DNA alvo gerada durante a qPCR. Esse corante permanece estável durante toda a reação de amplificação (RAMOS-PAYAN et al., 2003; PAUDEL et al., 2011).

A especificidade do ensaio de qPCR é determinada pelos *primers* e condições de reações aplicadas. Entretanto, há sempre a possibilidade de, mesmo diante da utilização de *primers* bem delineados, estes possam ligar entre si, formando *primers-dimers*, ou, ainda, pode ocorrer a amplificação de produtos inespecíficos. Diante dessas possibilidades, há a necessidade confirmação da especificidade da reação e isso é possível através da análise da curva de *melting* (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

Na avaliação da curva de *melting* (ou curva de dissociação) é possível determinar o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos *primers* das sequências alvo, ou seja, permite a identificação do fragmento do produto amplificado através de uma temperatura específica, temperatura de *melting* (TM). A TM corresponde à temperatura onde metade das fitas de DNA está na forma de fitas simples e a outra metade na forma de dupla hélice, e devido a essa dissociação na cadeia de DNA, os corantes marcadores então são liberados e detectados. A inclusão da avaliação dessa curva é primordial para determinar se houve formação de um único produto ou se houve formação de produtos inespecíficos (PÉREZ et al., 2011; PAUDEL et al., 2011).

As principais vantagens da qPCR em relação a PCR convencional é que a primeira permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam realizados em uma única etapa, obtendo resultados rápidos, diminuindo o risco de contaminação da amostra e garantindo maior precisão. Além disso, a qPCR combina detecção e quantificação através da emissão de fluorescência o que permite o monitoramento da reação em tempo real, uma vez que a cada ciclo de amplificação são gerados dados. O contrário acontece na PCR convencional, onde os dados são analisados somente ao final da reação, pela eletroforese em gel (KUBISTA et al., 2006).

#### 1.4.4.3 Sequenciamento

Na década de 1970, dois experimentos possibilitaram o desenvolvimento de métodos de obtenção da sequência de fragmentos de DNA em laboratório (MAXAM; GILBERT, 1977; SANGER; COULSON, 1975). Um desses métodos, até então chamado de terminação da cadeia ou sequenciamento dideoxi, ficou conhecido como método de Sanger de sequenciamento. Posteriormente, na década de 1980, foram desenvolvidos os primeiros protótipos de sequenciadores semiautomáticos, o que fez do método de Sanger o mais comumente utilizado para sequenciamento. Concomitantemente, o desenvolvimento de algoritmos para montagem de genomas a partir de fragmentos sequenciados, fez desse método a principal ferramenta para sequenciamento do genoma humano e de outros organismos nos anos subsequentes (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001)

O princípio da replicação de DNA foi usado por Sanger et al. (1977) para o desenvolvimento da técnica de sequenciamento. A vantagem desse processo está na habilidade da DNA polimerase em incorporar 2'-3' dideoxynucleotídeos, nucleotídeo análogo que falta do grupo 3'-hidroxi, essencial na formação da ligação fosfodiéster.

O sequenciamento pelo método de Sanger requer um produto de DNA, DNA polimerase, *primer*, ddNTPs (didesoxirribonucleosídeos trifosfatados), dNTPs (desoxirribonucleosídeos trifosfatados) e tampão para a reação. São configuradas quatro reações distintas, cada uma contendo um nucleotídeo radioativamente marcado (ddA, ddC, ddG, ddT). Em cada etapa da extensão da cadeia de nucleotídeos, a DNA polimerase adiciona um dNTP ou o ddNTP correspondente, dependendo da concentração de cada um na reação. Quando um dNTP (adenina, citosina, guanina ou timina) é adicionado a uma extremidade 3', a extensão da cadeia é continuada. Porém, quando um ddNTP (ddA, ddC, ddG, ddT) é adicionado a essa extremidade, a extensão cessa. Os produtos da extensão são então separados por eletroforese (APPLIED BIOSYSTEMS, 2009).

### *1.5 Prevenção e controle da franciselose*

Atualmente, não há vacinas comerciais disponíveis para a prevenção da franciselose em peixes (SOTO et al., 2014). Algumas empresas estão trabalhando no desenvolvimento de vacinas para a doença. Testes estão sendo realizados em bacalhau na Noruega, mas ainda sem resultados satisfatórios (COLQUHOUN; DUODU, 2011). Soto et al. (2011) elaboraram uma vacina feita com uma cepa de *Francisella asiática* mutante para um dos seus genes que conferem patogenicidade. Tilápias jovens foram desafiadas sendo submersas por 30 minutos ou 180 minutos em água contendo as bactérias mutantes. Foi observado uma mortalidade de 80 % nos peixes que não foram vacinados (controle) e de 20 % a 30 % nos peixes que receberam a vacina e que permaneceram 180 minutos na água contaminada experimentalmente.

Segundo Kubitzka (2008), o controle e a prevenção da franciselose em tilápias no Brasil são realizados na forma de aplicação de boas práticas na

produção e no manejo sanitário para a prevenção de doenças. Tais práticas abrangem:

(a) monitoramento contínuo e manutenção de adequada qualidade da água nos tanques e, no caso de tanques-rede em reservatórios de hidrelétricas, uma análise criteriosa dos possíveis riscos associados e se possível, o histórico da qualidade dessa água;

(b) adequada nutrição e alimentação, com ajustes nos níveis nutricionais da ração e no tamanho dos *pellets* conforme as fases de crescimento;

(c) cuidados na introdução de alevinos, juvenis e reprodutores, dando preferência a aquisição de animais de produtores que aplicam boas práticas de manejo sanitário;

(d) manter novos estoques adquiridos, separados do plantel já existente para quarentena;

(e) atenção constante ao comportamento dos peixes, com remoção imediata de peixes doentes ou mortos e isolamento das unidades de produção onde esses peixes habitavam;

(f) exames de rotina para detectar problemas, mesmo em lotes de peixes aparentemente saudáveis;

(g) evitar o uso indiscriminado de terapêuticos;

(h) realizar a desinfecção de equipamentos periodicamente.

Para Klinger-Bowen et al. (2012) peixes acometidos por *Francisella noatunensis orientalis* tendem a não se alimentarem, por esse motivo, é indicado o uso de antibióticos como medida profilática, sendo a administração dos fármacos realizada dias antes da diminuição da temperatura da água, antecipando assim uma provável infecção.

Já Colquhoun e Duodu (2011) afirmaram que o uso de antibióticos para tratamento da franciselose pode não oferecer efeito satisfatório e duradouro, uma vez que a bactéria é intracelular, a doença é caracterizada por alta prevalência e transmissibilidade, baixa dose infectante e causa inapetência em peixes severamente infectados. Porém, alguns estudos demonstram que a oxitetraciclina (CHERN; CHAO, 1994) e a tetraciclina (MAUEL et al., 2005; OSTLAND et al., 2006) demonstraram certo grau de eficácia para o tratamento da franciselose. Soto et al. (2011) verificaram a eficiência do florfenicol no tratamento de tilápias juvenis experimentalmente infectadas com *Francisella*

spp. e observaram uma eficiência de 100 % no grupo tratado após 30 dias do desafio, enquanto que no grupo controle, que não recebeu o medicamento, a mortalidade nesse período foi de 70 %.

A *United States Food and Drugs Administration* (FDA) permite o uso de três antibióticos em ração de peixes: Florfenicol, Oxitetraciclina e Sulfadimetoxina/ormetropim (FDA, 2016). No Brasil, a Instrução Normativa nº 13 de 15 de julho de 2015 dispõe sobre o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes para as cadeias de carnes e estabelece os limites máximos de resíduos de antimicrobianos que podem estar presentes na carne de peixes de cultivo. Nessa normativa, dentre os antibióticos relacionados, constam os autorizados pelo FDA com seus respectivos limites residuais permitidos na carne dos peixes (BRASIL, 2015b).

É válido ressaltar que os produtores que optarem pelo uso de antibióticos devem contar com o suporte de profissional especializado e tomar como referência o antibiograma realizado contra as bactérias patogênicas isoladas de peixes doentes. E ainda, no caso de tratamento de peixes com peso próximo ao indicado para abate, deve-se respeitar o período de carência do medicamento utilizado indicado pelo fabricante (KUBITZA; KUBITZA, 2013).

Os imunostimulantes são substâncias químicas, sintéticas ou biológicas que atuam no sistema imune específico, aumentando a atividade fagocítica e bactericida das células de defesa, melhorando a resistência do peixe a doenças infecciosas. Seu uso pode ser uma interessante alternativa a ser aplicada nas boas práticas de manejo no intuito de reduzir ou não utilizar antimicrobianos no ciclo de produção de tilápias (BRICKNELL; DALMO, 2005).

Diversos ingredientes utilizados na ração podem ajudar a fortalecer a resposta imunológica dos peixes às diversas enfermidades, bem como auxiliar no equilíbrio da microflora intestinal, facilitando e potencializando a absorção de nutrientes. Sob a ótica da imunonutrição, a inclusão desses ingredientes às rações tem sido uma importante prática para redução do uso de medicamentos, em especial antibióticos, resultando em uma melhor percepção e segurança no consumo da carne desses peixes (KUBITZA; KUBITZA, 2013).

A eficácia dessas práticas está diretamente relacionada à qualidade sanitária dos peixes comercializados. A conscientização dos produtores em

relação aos riscos e da importância desse manejo preventivo são de suma importância na garantia da saúde da população.

### 1.6 Produção

A produção de peixes no Brasil, segundo fonte do IBGE (2014) movimentou um montante de mais de dois milhões e setecentos mil reais em 2014, com uma produção total de mais de 474 toneladas. Nesse contexto, Minas Gerais aparece com uma produção total de mais de 16 toneladas de peixes produzidos, movimentando mais de 98 milhões de reais. Nesse mesmo ano, a tilápia foi a espécie mais cultivada no Brasil (198,7 toneladas) e o estado de Minas Gerais foi responsável por 16.530 toneladas desse montante (IBGE, 2014).

Estudo realizado pelo *Rabobank*, principal banco financiador agrícola do mundo, mostra que a aquicultura pode ser, na próxima década, a nova fronteira de proteína animal no Brasil. Na pesquisa, os dados mostram que a produção de peixe em cativeiro poderá alcançar 960 mil toneladas em 2022 (BRASIL, 2015c).

As tilápias são eficientes no aproveitamento de alimentos naturais, o plâncton. Em estudo realizado por Schroeder (1983) em viveiros com baixa renovação de água, cerca de 50 % a 70 % do crescimento de tilápias foi atribuído ao consumo de alimentos naturais, mesmo recebendo ração suplementar. Esse fato explica o menor custo de produção de tilápias em viveiros de baixa renovação de água comparado ao cultivo intensivo em tanques-rede (KUBITZA, 1999).

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A deficiência nos dados de produção das tilápias na bacia hidrográfica do rio Araguari na mesorregião do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil, devido à ilegalidade da atividade leva à desinformação também em relação a sanidade dos peixes cultivados, ocasionando a subnotificação de doenças. Isso pode

gerar sérios prejuízos aos produtores e à saúde da população exposta ao consumo desses peixes.

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivos:

- (a) Detectar e determinar a prevalência de *Francisella noatunensis orientalis* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em tanques-rede em represas da bacia hidrográfica do rio Araguari, Minas Gerais, Brasil.
- (b) Identificar se a espécie *Francisella noatunensis orientalis* está presente nessa região, com o auxílio do sequenciamento pelo método de Sanger.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Número de amostras

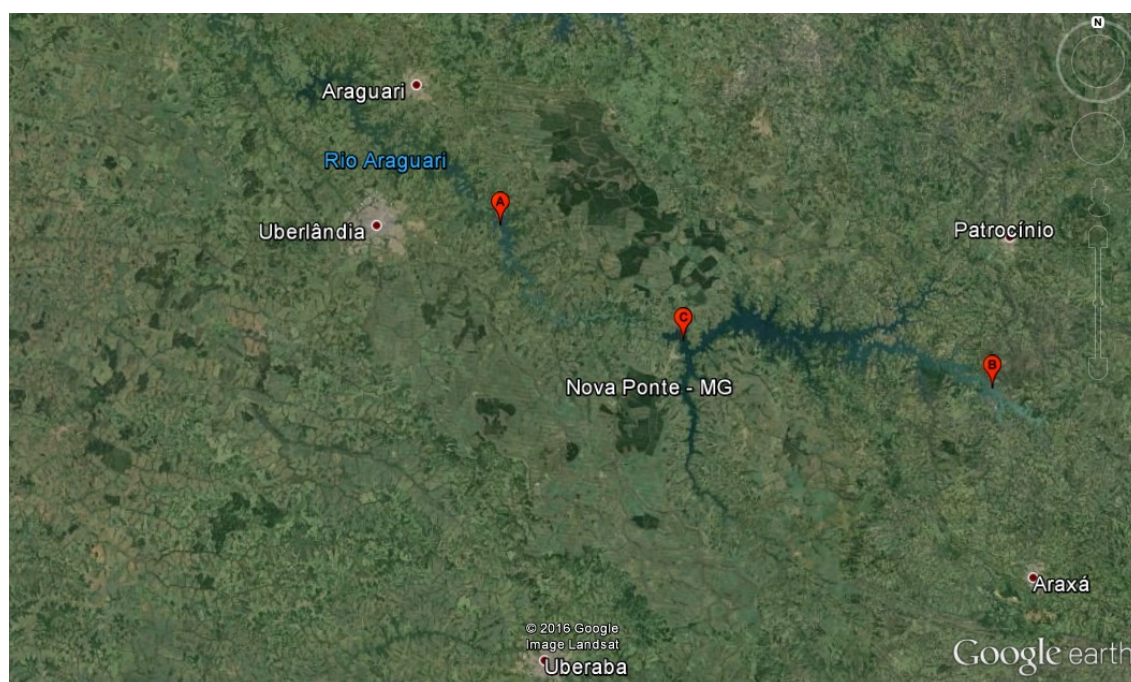
Com base nas pesquisas realizadas com sanidade de *O. niloticus*, no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) no Campus de Botucatu – São Paulo – Brasil, observou-se prevalência de 10 % para *Francisella* spp. (RODRIGUES, 2016) \*. Esse valor percentual foi utilizado para definir o número de animais a serem amostrados. Dessa forma, para o cálculo da amostragem foi utilizado o programa do site OpenEpi (DEAN et al., 2013) onde foi selecionado o método de prevalência (estudo transversal). A amostragem mínima calculada para este tipo de estudo foi de 139 animais com intervalo de confiança de 95 %. Para evitar erros de amostragem, aumentou-se o valor para 150 peixes.

---

\*Rodrigues, M.V. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Botucatu (comunicação pessoal, 2016).

### 3.2 Amostras

Nos meses de novembro e dezembro de 2015, 150 tilápias em idade adulta foram selecionadas aleatoriamente, após a insensibilização em água gelada, em três frigoríficos distintos (50 em cada estabelecimento), todos inspecionados pelo Instituto Mineiro de Agropecuária, oriundas de criatórios em tanques-rede, localizados na bacia hidrográfica do Rio Araguari que se localiza na mesorregião do Triângulo Mineiro, na porção oeste do Estado de Minas Gerais - Brasil, entre as coordenadas geográficas de 19°35'21.67" de latitude Sul e 44° 39'16.44" de longitude Oeste de Greenwich (Figura 15) o qual ocupa uma área de 20.186 Km<sup>2</sup>, abrangendo parte de 20 municípios (BRITO; ROSA, 2003).



**FIGURA 15.** Vista da bacia hidrográfica do Rio Araguari na mesorregião do Triângulo Mineiro, a uma distância aproximada de 207,07 Km (Fonte: Google Earth, 2016).

Foram mensurados a massa corpórea (g) e o comprimento padrão (cm) dos animais. Em seguida, os peixes foram submetidos a necropsia conforme descrita por Noga (2010). Todas as alterações macroscópicas observadas e sexo foram anotadas em planilhas próprias para esse fim.

Após a abertura da cavidade celomática, o baço foi retirado com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, transferido para tubo estéril devidamente identificado e imediatamente acondicionado em caixa isotérmica com temperatura de 4°C. No laboratório, as amostras foram congeladas a -18°C e, posteriormente, foram realizados os testes moleculares.

### 3.3 Identificação de *Francisella spp.* por qPCR

#### 3.3.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA, foi utilizado o Kit GENEJet Genomic DNA Purification (Thermo Scientific). Foi transferido 10 mg de baço para um tubo estéril livre de ácidos nucleicos. Em seguida, esse material foi ressuspenso em 180 µL de solução de digestão, acrescido de 20 µL de Solução de Proteinase K e homogeneizado até obtenção de uma solução uniforme. A amostra foi incubada a 56°C, sob agitação ocasional, por três horas, até a completa lise do tecido. Em seguida, foi adicionado 20 µL de solução de RNase A e incubada a temperatura ambiente por dez minutos para se obter apenas DNA na solução eluída. Foi acrescentado 200 µL de solução de lise e homogeneizada por quinze segundos para romper a membrana citoplasmática e nuclear. Foram adicionados 400 µL de etanol a 50 %. Esse preparado lisado foi transferido para uma coluna específica do kit inserida a um tubo coletor, no qual, o DNA possui afinidade eletrostática pela membrana de sílica. O conjunto foi centrifugado por um minuto a 6000 x g. O tubo coletor foi então descartado, a coluna colocada em um novo tubo coletor e acrescida de 500 µL de tampão de lavagem I (adicionada de etanol). O conjunto foi centrifugado por um minuto a 8000 x g. O líquido que passou pela membrana de sílica foi descartado e a coluna recolocada no mesmo tubo coletor. Posteriormente, 500 µL de tampão de lavagem II (adicionada de etanol) foi adicionado e o conjunto centrifugado por três minutos a velocidade máxima ( $\geq 12000$  x g). Foi descartado o tubo coletor para remover todos os resíduos celulares e sais presentes nas soluções utilizadas. A coluna foi transferida para um tubo estéril (1,5 mL) de microcentrifuga. Foi adicionado 200 µL de solução de eluição para eluir o DNA genômico. O conjunto ficou a

temperatura ambiente por dois minutos e foi centrifugado por um minuto a 8000 x g. Enfim, a coluna de purificação foi descartada e o DNA purificado foi imediatamente utilizado. Para a quantificação e avaliação da qualidade do purificado, foi realizada a relação de 260/280 no Nanodrop 2000c.

### 3.3.2 qPCR

As amostras foram processadas no Laboratório do Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) no Campus de Botucatu – São Paulo – Brasil. Para a extração do DNA, o baço foi pesado em novos tubos livres de ácidos nucleicos de 1,5 mL em uma balança analítica até atingir 10 mg. Em seguida, o tecido foi macerado e submetido à extração de DNA com o Kit GENEJET Genomic DNA Purification (Thermo Scientific®) conforme recomendação do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação e a avaliação da correlação de 260/280 para verificar o grau de pureza das amostras. Foram utilizadas amostras com concentração acima de 5 ng/μL e relação acima de 1,7.

Após a extração de DNA, todas as amostras foram submetidas a qPCR para detecção de *Francisella noatunensis orientalis*. O par de *primers* utilizado que reconhece o gene *iglC* da região ribossomal 16S e o tamanho esperado do produto (SOTO et al., 2010) estão listados na Tabela 1.

**TABELA 1.** *Primers* utilizados para pesquisa de *Francisella noatunensis orientalis*.

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5' a 3')</b>	<b>Tamanho esperado do produto</b>
IglcF	GGGCGTATCTAAGGATGGTATGAG	88 pb
IglcR	AGCACAGCATAACAGGCAAGCTA	

O *mix* da reação de qPCR foi constituído de 12,5 µL de Gotaq qPCR Mastermix 2X (Promega®), 0,5 µL (concentração 10,0 pmol/µL) de cada *primer* (iglC foward e iglC reverse), 4,0 µL de DNA extraído e 7,5 µL de água livre de ácidos nucleicos. Todas as amostras apresentaram relação 260/280 acima de 1,7, não havendo a necessidade de nova extração. Como controle positivo foi utilizado DNA da bactéria *Francisella noatunensis orientalis* previamente identificada, sequenciada e caracterizada (RODRIGUES, 2016) \*.

Para a realização da qPCR foi feita a desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C por um minuto. A reação foi realizada no termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-time PCR Systems (Applied Biosystems/ Life Technologies®). Para a visualização dos resultados foram analisadas as curvas de amplificação e de *melting*, comparando com o controle positivo e negativo.

### 3.4 Sequenciamento

Duas amostras positivas na qPCR, oriundas dos frigoríficos A e C, foram então purificadas do amplificado utilizando o kit Illustra Microspin™ S-400 HR Columns kit (GE Healthcare®) conforme recomendação do fabricante.

O sequenciamento foi realizado pelo Método de Sanger (SANGER et al., 1977). Os *amplicons* foram sequenciados usando o BigDye™ Terminator Cycle sequencing kit (Applied Biosystems®) no sequenciador Applied Biosystems capillary 3500 Genetic Analyser. A qualidade dos electroferogramas foi realizada no programa Sequencing Analysis version 5.4 (Applied Biosystems®). Após a obtenção das sequências, estas foram alinhadas após a remoção dos *primers* e gerado o consenso no software Bioedit versão 7.2.5 (Hall, 1999). Posteriormente, as sequências foram submetidas no banco de dados do *genbank* para pesquisa de similaridade com outras sequências com o uso do algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

---

\*Rodrigues, M.V. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Botucatu (comunicação pessoal, 2016).

### 3.5 Análise estatística

O estudo estatístico do sexo, da massa corpórea e do comprimento das tilápias foi realizado através da análise de variância Anova e complementado com o teste de comparações múltiplas de Kramer-Tukey. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para determinar a associação entre a prevalência da *Francisella* spp., o sexo e o tamanho dos peixes analisados. Para o teste do Qui-quadrado foi utilizado o Software R versão 2.14.2 de domínio público (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Os resultados do sexo, da massa corpórea e do comprimento das tilápias foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. As conclusões estatísticas foram realizadas com 5 % de significância (MONTGOMERY, 2013).

## 4. RESULTADOS

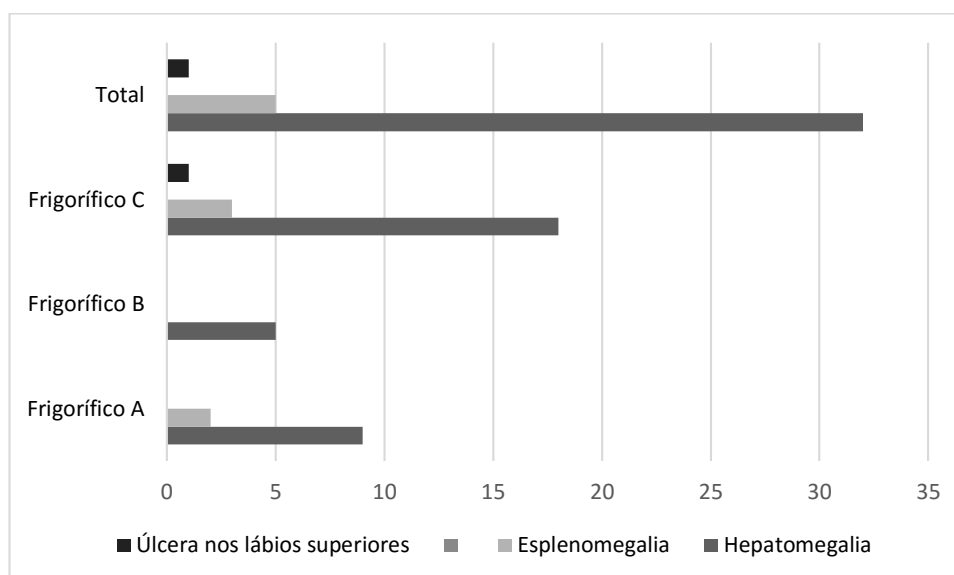
O estudo demonstrou que os peixes fêmeas apresentaram massa corpórea (g) e comprimento (cm) menores significativamente ( $p < 0,0001$ ) quando comparados com os machos (Tabela 2).

**TABELA 2.** Média  $\pm$  erro padrão da massa corpórea (g) e do comprimento (cm) de *Oreochromis niloticus* machos e fêmeas. Análise estatística complementado com o Teste Kramer-Tukey ( $p < 0,05$ ).

Análise	<i>n</i>	Macho	Fêmea	Média
Massa corpórea (g)	150	1 034,76 $\pm$ 19,32 B <sup>(1)</sup>	811,90 $\pm$ 36,84 A	1 003,56 $\pm$ 18,48
Comprimento (cm)	150	30,34 $\pm$ 0,20 B <sup>(2)</sup>	27,88 $\pm$ 0,43 A	29,99 $\pm$ 0,20

<sup>(1)</sup>  $p < 0,0001$ ; e <sup>(2)</sup>  $p < 0,0001$ .

Algumas lesões foram identificadas nos peixes avaliados. Hepatomegalia estava presente em 21,33 % (32/150) dos peixes, esplenomegalia em 4,16 % (5/150) e úlcera nos lábios superiores em 0,66 % (1/150). Frente as lesões observadas, durante a necropsia surgiu a hipótese de se tratar de uma infecção bacteriana. Pela presença de esplenomegalia foi realizado a qPCR para *Francisella* spp. (Figura 16).



**FIGURA 16.** Porcentagem (%) de lesões observadas nas tilápias (*Oreochromis niloticus*), presentes nos frigoríficos A, B e C, localizados na bacia hidrográfica do rio Araguari, Minas Gerais, Brasil.

As variáveis sexo e comprimento foram avaliadas para verificação se essas características são fatores de risco para o desenvolvimento da franciselose, observando a não significância ( $p > 0,05$ ) conforme dados expressos na Tabela 3.

**TABELA 3.** Associação entre a presença de *Francisella* spp. e sexo e comprimento das tilápias (*Oreochromis niloticus*) analisadas.

<b>Categoria</b>	<b>Positividade qPCR</b>	<b>Valor de p</b>
Sexo		0,16
Fêmea	9,52 % (2/21)	
Macho	3,10 % (4/129)	
Comprimento (cm) *		0,96
27,0	12,5 % (1/8)	
29,0	9,52 % (2/21)	
29,5	16,6 % (1/6)	
30,0	12,5 % (1/28)	
31,5	16,67 % (1/6)	

\* Os dados relativos ao comprimento das tilápias listados na tabela se referem as amostras positivas.

Dos 150 peixes analisados, seis foram positivos para *Francisella* spp. pela qPCR. Na Tabela 5, pode-se observar a prevalência de animais positivos para *Francisella* spp. por qPCR.

**TABELA 4.** Porcentagem (%) da lesão macroscópica e da confirmação laboratorial da presença de *Francisella* spp. pela qPCR em baço de tilápias machos e fêmeas.

<b>Análise</b>	<b>n</b>	<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>	<b>Média</b>
qPCR	150	3,10 % (4/129)	9,52 % (2/21)	4,00 % (6/150)

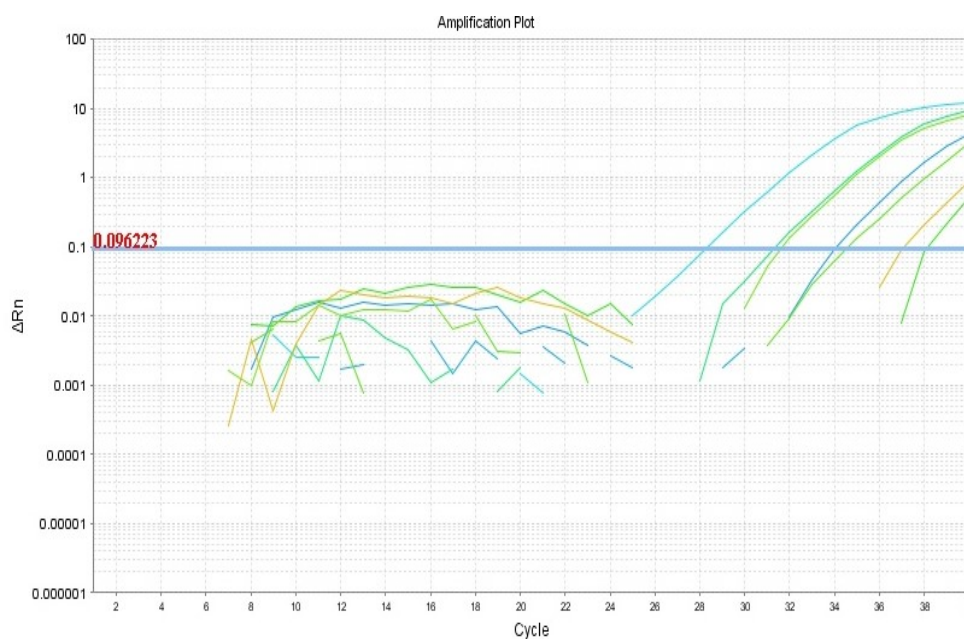
<sup>(1)</sup> O numerador é o número de positivo para *Francisella* spp. e o denominador é o número total na razão.

Das amostras analisadas, seis foram positivas para *Francisella* spp. pelo teste de qPCR, o que corresponde a prevalência de 4 %. Os dados de *threshold cycle* e temperatura de *melting* das amostras positivas, controles positivo e negativo estão expressos na Tabela 6.

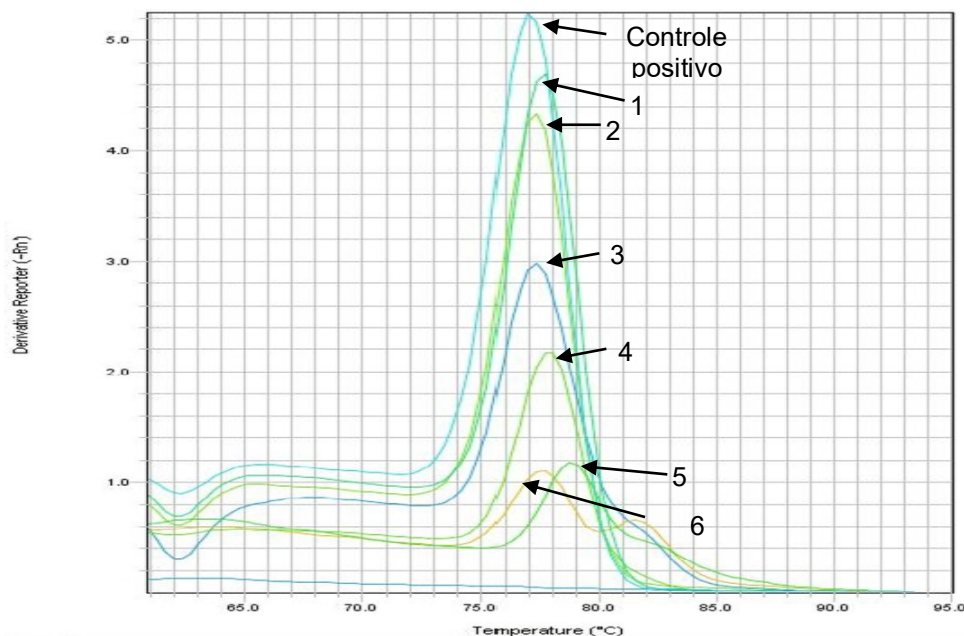
**TABELA 5.** Valores de *cycle threshold* e temperatura de *melting* das amostras positivas e dos controles positivo e negativo para *Francisella* spp. realizados pela qPCR.

<b>Amostra</b>	<b>Cycle Threshold</b>	<b>Temperatura de Melting (°C)</b>
1	35,831	77,550
2	28,985	77,163
3	31,716	77,337
4	34,640	77,862
5	31,406	77,687
6	28,379	76,988
Controle positivo	28,675	76,660
Controle negativo	Indeterminado	61,971

Os pontos de amplificação das amostras positivas em relação ao controle, com a representação do *Threshold* e a curva de *Melting* estão demonstrados na Figuras 17 e 18, respectivamente.



**FIGURA 17.** Ponto de amplificação das 6 amostras positivas de baço de tilápias na qPCR para *Francisella* spp. em comparação com o controle positivo *Francisella noatunensis orientalis*.



**FIGURA 18.** Curva de *Melting* para as 6 amostras positivas de baço de tilápias comparadas ao controle positivo *Francisella noatunensis orientalis*.

Das seis amostras positivas, duas foram provenientes do frigorífico A e quatro do frigorífico C. A quantidade de amostras positivas distribuídas por frigorífico, com suas respectivas prevalências estão descritas na Tabela 7.

**TABELA 6.** Distribuição e prevalência de amostras de baço de *Oreochromis niloticus* positivas para *Francisella* spp. pelo método de qPCR nos frigoríficos da região da bacia hidrográfica do rio Araguari, Minas Gerais, Brasil.

Frigorífico	Amostras positivas	Prevalência (%)
A	2/50	4
B	0/50	0
C	4/50	8
Total	6/150	4

O resultado do sequenciamento para confirmação e identificação da espécie bacteriana encontrou 98 % de similaridade com a sequência de *Francisella noatunensis orientalis*, cepa FNO01, genoma completo, número de acesso CP012153, confirmando a espécie detectada pela qPCR.

## 5. DISCUSSÃO

A proporção de *O. niloticus*, machos e fêmeas, relatada na pesquisa demonstra que a quantidade de machos (86 %) foi superior à de fêmeas (14 %). Isso se deve ao processo de inversão sexual aplicado na produção para controle populacional. Esse fato associado à homogeneidade das amostras no que se refere a comprimento, massa corpórea e sexo, explica a não significância dessas características (Tabelas 2 e 3) como fatores de risco à franciselose.

Dentre as lesões observadas, a esplenomegalia foi a mais frequente e pode sugerir a presença de um processo infeccioso. Não foram observados granulomas multifocais em órgãos nos peixes estudados, o que sugere a não associação dessa lesão macroscópica à presença de *Francisella* spp. Outros estudos relatam a correlação de *Francisella* spp. com a doença granulomatosa principalmente em baço e rins de *O. niloticus* (MAUEL et al., 2005; MAUEL et al. 2007; SOTO et al. 2009b; OTTEM et al., 2009; JEFFERY et al., 2010; NGUYEN et al., 2015; LIN et al., 2015) bem como em outras espécies de peixes (FUKUDA et al., 2002; OSTLAND et al., 2006). Vale ressaltar que embora não tenha sido observado granuloma pela macroscopia, essa lesão pode ser observada pela microscopia, técnica não utilizada neste trabalho.

Oliveira et al. (2014) em investigação de surtos nos estados de Minas Gerais e São Paulo, durante os anos de 2012 a 2014, submeteram *O. niloticus* com sintomatologia clínica a exame bacteriológico e necropsia. Os autores observaram uma maior frequência da doença em períodos de inverno, com a temperatura da água inferior a 22°C e os animais mais susceptíveis foram alevinos, juvenis e adultos juvenis. No presente estudo, *Francisella noatunensis orientalis* foi isolada de peixes adultos e no verão, onde a idade do peixe e a temperatura da água não são fatores de predisposição dos animais à franciselose.

Um ponto importante é que embora tenha ocorrido uma prevalência baixa, mostra-se que a bactéria permanece no ambiente e pode infectar animais que apresentem o sistema imunológico deficiente ou com solução continuidade causado por traumas ocasionados por manejo, brigas ou parasitismo, ocasionando sérios prejuízos para os produtores.

A qPCR para diagnóstico de doenças em peixes tem sido utilizada por ser uma técnica de alta especificidade e sensibilidade. Neste estudo foi observado que a curva de *melting* apresentava apenas um pico e na amplificação não foi visualizada positividade de amostras negativas, demonstrando sua especificidade. Além disso, esta técnica fornece resultados rápidos e de custo relativamente baixo para o produtor. Diversos autores aplicaram essa técnica para identificação de *Francisella* spp. em peixes (OTTEM et al., 2008; BIRKBECK et al., 2001; COLQUHOUN; DUODU 2011; JACOB et al., 2011; OLIVEIRA et al. 2014; RUANE et al., 2015), seguido do sequenciamento da porção 16S do RNA ribossomal para identificação de *Francisella noatunensis orientalis* (NYLUND et al., 2006; COLQUHOUN; DUODU, 2011; OLIVEIRA et al. 2014; NGUYEN et al. 2015; RUANE et al. 2015).

Na reação de qPCR, a detecção da fluorescência para um determinado gene é proporcional a quantidade desse gene na amostra, assim quanto maior a quantidade de gene mais precocemente será detectada a fluorescência (VELASCO et al., 2006) corroborando com os resultados desse estudo como mostra a Tabela 5. Dessa forma, foi possível verificar que as amostras 2 e 6 apresentaram valores de Ct mais baixos e próximos do controle positivo. Isso demonstra que esses peixes provavelmente tinham uma carga bacteriana maior que os outros animais. Esse ponto é fundamental para avaliar o grau de infecção e sua patogenicidade.

O diagnóstico da franciselose pela qPCR seguida pelo sequenciamento da região 16S RNAr tem possibilitado a identificação dos seguintes micro-organismos: *Francisella tularensis* com 97 % de similaridade, *Francisella philomiragia* com 98 % de similaridade e 99 % para outras espécies da bactéria deste gênero (OSTLAND et al., 2006; MAUEL et al., 2007; MIKALSEN et al., 2007; OTTEM et al., 2007; SOTO et al., 2009b). Resultado similar foi encontrado no presente estudo, onde o diagnóstico da franciselose pela qPCR seguida do

sequenciamento do gene *iglC* da região 16S ribossomal permitiu identificar a bactéria *Francisella noatunensis orientalis* com 98 % de similaridade.

Os primeiros relatos reconhecidos de *Francisella noatunensis orientalis* em tilápias (*Oreochromis* spp.) aconteceram em Taiwan em 1992 (CHEN et al., 1994; CHERN; CHAO, 1994). Posteriormente, esse micro-organismo foi identificado em outras localidades como os Estados Unidos da América (MAUEL et al., 2007), mais especificamente na Costa Rica (MIKALSEN; COLQUHOUN, 2009; SOTO et al., 2009b), Indonésia (OTTEM et al., 2009) e Inglaterra (JEFFERY et al., 2010). Essa bactéria já foi relatada em outras espécies de peixes na Califórnia e no Japão, em animais importados da China (FUKUDA et al., 2002; OSTLAND et al., 2006).

Na Tailândia, os vários surtos indicativos de franciselose tem ocorrido em tilápias vermelhas (*Oreochromis* spp.) que são cultivadas em sistema de tanques-rede desde o ano de 2012. Esses surtos foram investigados e *Francisella noatunensis orientalis* foi identificada como sendo o patógeno responsável pela sintomatologia clínica nos peixes (NGUYEN et al., 2015).

Lin et al. (2015) investigaram um surto de doença granulomatosa em tilápias (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cultivadas em viveiros no sul da China. Os resultados confirmaram a presença *Francisella noatunensis orientalis* em baços com lesões. Esse foi o primeiro relato de franciselose em tilápias cultivadas em viveiro na China.

As informações contidas no presente trabalho sobre a prevalência de franciselose em tilápias no estado de Minas Gerais – Brasil é de suma importância epidemiológica para posteriores definições efetivas de métodos de prevenção e controle. Leal et al. (2014) apresentaram o primeiro relato confirmado de *Francisella noatunensis orientalis* no país, porém não foi uma pesquisa de caráter epidemiológico. No estudo, os autores avaliaram 44 peixes (*O. niloticus*), alevinos e juvenis com sintomatologia clínica para franciselose, cultivadas em sistemas de tanques-rede, provenientes de surtos descritos em cinco regiões distintas do Estado de Minas Gerais, Brasil.

Segundo Alfjorden e Ruane (2015), a prevalência de peixes infectados em uma população pode ser alta pelo fato da franciselose ser uma doença crônica na natureza e de alta infectividade. Esses autores, em um estudo realizado no sudeste da Noruega, relataram a prevalência de 6,8 % de *Francisella*

*noatunensis* em bacalhau (*Gadus morhua* L.). Soto et al. (2013a) observaram uma alta prevalência de *Francisella noatunensis orientalis* em *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis hornorum*, *Oreochromis aureus* e *O. niloticus* no Havaí, utilizando a técnica de qPCR para o diagnóstico.

No presente estudo foi observada prevalência de *Francisella* spp. relativamente baixa em tilápias, porém quando se avalia o volume de produção da tilapicultura, sabe-se que a perda econômica devido a mortalidade e perda no ganho de peso é expressiva.

Outro fator importante é que devido ao fato de a franciselose ter sido detectada em período de temperaturas quentes (novembro e dezembro) na região estudada, pode-se concluir que este agente pode permanecer no ambiente, sendo um grande problema para a piscicultura. Este fato é esclarecido pelo estudo realizado por Soto et al. (2015), o qual indicou a formação de biofilmes dessa bactéria em até 24 horas após a inoculação em ambiente controlado, com a água em diferentes temperaturas e níveis de salinidade. Tais fatos expressam a fundamental relevância do estudo no que se refere às práticas de prevenção a serem aplicadas pelos produtores e responsáveis técnicos no intuito de controlar a doença em seus plantéis.

Práticas efetivas para o controle e prevenção da *Francisella* spp. nos cultivos de *O. niloticus* envolvem basicamente o desenvolvimento de programas sanitários de monitoramento de alevinos, controle estrito do trânsito de animais, monitoramento contínuo e manutenção de adequada qualidade da água, adequada nutrição e alimentação, desenvolvimento de vacinas a médio prazo e exames laboratoriais de rotina mesmo em lotes aparentemente saudáveis (KUBITZA, 2008).

Mais estudos sobre a prevalência de *Francisella* spp. em tilápias devem ser realizados em outras regiões do Brasil, com o objetivo de esclarecer sobre a real situação desse micro-organismo nos plantéis e o prejuízo econômico decorrente de sua presença, o que servirão de suporte para as autoridades sanitárias.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo indicam que a *Francisella noatunensis orientalis* está presente nos criatórios de tilápias da região da bacia hidrográfica do rio Araguari, Minas Gerais, Brasil. O sexo e o tamanho dos peixes não influenciam na taxa de infecção deste micro-organismo. Mesmo com a prevalência numérica relativamente baixa, esse achado pode levar à instauração, por parte dos órgãos governamentais, de condutas de vigilância dos casos de franciselose no país, devido às importantes perdas econômicas geradas por seu agente etiológico em fazendas de cultivo de *Oreochromis niloticus*.

## 7. REFERENCIAS

ALFJORDEN, A.; RUANE, N. Francisellosis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **International Council for the Exploration of the Sea (ICES)** - Identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish, Leaflet No. 64, 4p. 2015.

APPLIED BIOSYSTEMS. DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. **Applied Biosystems Chemistry Guide**. Second Edition. 2009. Disponível em: [https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/geraldocuments/cms\\_041003.pdf](https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/geraldocuments/cms_041003.pdf). Acesso em: 14 de abr. 2016.

AUSTIN, B; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens. Disease of farmed and wild fish**. Editora Springer Dordrecht Heidelberg. New York. London. 5ª. edição. 651p. 2012.

BAKER, C.N.; HOLLIS, D.G.; THORNSBERRY, C. Antimicrobial susceptibility testing of *Francisella tularensis* with a modified Mueller-Hinton broth. *Journal of clinical Microbiology*, v.22, p.212-215. 1985.

BARROSO, R.M.; TENÓRIO, R.A.; PEDROZA FILHO, M.X.; DANIEL CHAVES WEBBER, D.C.; BELCHIOR, L.S. TAHIM, E.F.; CARMO, F.J. MUEHLMANN, L.D. Gerenciamento genético da tilápia nos cultivos comerciais. **Documentos Embrapa Pesca e Aquicultura**. Palmas, TO, 64p. 2015.

BARTHOLOMEW, K. D. A. A. J. L. Chapter 8 - *Piscirickettsia*, *Francisella* and *Epitheliocystis*. In: WOO, P. T. K. (Ed.). **Fish Diseases and Disorders**, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. 2. Preston, UK.: CABI, v.3, cap. 8, p.302-337.2011.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p.517-525. 2002.

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

BRASIL. 2004. SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA. Instrução Normativa Interministerial nº 06 de 31 de maio de 2004. Estabelece as normas complementares para a autorização de uso dos espaços físicos em corpos d'água de domínio da União para fins de aqüicultura, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Seção 1, p. 6 - 15. Brasília, DF, 31 mai. 2004.

BRASIL. 2010. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010. [Online]. *Ministério da Pesca e Aquicultura*. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/files/docs/InformacoeseEstatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf>. Acesso em: 06 de abr. 2016.

BRASIL. 2011. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011.[Online]. *Ministério da Pesca e Aquicultura*. Disponível em: [http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim MPA 2011pub.pdf](http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim%20MPA%202011pub.pdf). Acesso em: 06 de abr. 2016.

BRASIL. 2015a. SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. Consumo de pescado no Brasil está abaixo do recomendado pela OMS. Publicado em 01 de set. 2015. Disponível em: <http://sna.agr.br/consumo-de-pescado-no-brasil-esta-baixo-do-recomendado-pela-oms/>. Acesso em: 06 de jan. 2016.

BRASIL. 2015b. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 13 de 15 de julho de 2015. Publica o Subprograma de Monitoramento e Subprograma Exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC de 2015 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equina, coelho, aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Seção 1, nº.136, p.5 -12. Brasília, DF, 20 jul. 2015.

BRASIL. 2015c.GLOBO RURAL. Piscicultura pode alcançar 960 mil toneladas em 2022. Publicado em 31 de mar. 2015. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/Noticias/noticia/2015/03/piscicultura-pode-alcançar-960-mil-toneladas-em-2022.html>. Acesso em: 15 de abr. 2016.

BRASIL. 2016. CORREIO DE UBERLÂNDIA. Produtores querem dobrar a produção de tilápia na região. Publicado em 02 de jan. 2016. Disponível em: <http://www.correiodeuberlandia.com.br/cidade-e-regiao/produtores-querem-dobrar-a-producao-de-tilapia-na-regiao/>. Acesso em: 02 de jan.2016.

BRETT, M.E.; RESPICIO-KINGRY, L.B.; YENDELL, S.; RATARD, R.; HAND, J.; BALSAMO, G.; SCOTT-WALDRON, C.; O'NEAL, C.; KIDWELL, D.; YOCKEY, R.; SINGH, P.; CARPENTER, J.; HILL, V.; PETERSEN, K.M.; MEAD, P. Outbreak of *Francisella novicida* Bacteremia Among Inmates at a Louisiana Correctional Facility. **Clinical Infectious Diseases**, v.59, n.6, p.826–833. 2014.

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

BRICKNELL, J.R.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish Shellfish Immunology**, v.19, p.457-472. 2005.

BRITO, J.L.S.; ROSA, R. Elaboração do mapa de solos da bacia do Rio Araguari na escala de 1:500.000. **II Simpósio Regional de Geografia “Perspectivas para o cerrado no século XXI**. Universidade Federal de Uberlândia – Instituto de Geografia. 2003. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Mapa\\_Solos\\_Bacia\\_AraguariID-L6FFnePUVy.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Mapa_Solos_Bacia_AraguariID-L6FFnePUVy.pdf). Acesso em: 06 de abr. 2016.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFI, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, n.4, p.611-622. 2009.

CAMUS, A.C.; DILL, J.A.; MCDERMOTT, A.J.; CLAUSS, T.M.; BERLINER, A.L.; BOYLAN, S.M.; SOTO, E. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infection in Indo-Pacific reef fish entering the United States through the ornamental fish trade. **Journal of Fish Diseases**, v.36, n.681–684. 2013.

CANE, P.A.; COOK, P.; RATCLIFFE, D.; MUTIMER, D.; PILLAY, D. Use of real-time PCR and fluorimetry to detect Lamivudine resistance-associated mutations in Hepatitis B virus. **Antimicrobial. Agents Chemother**, v.43, p.1600–1608. 1999.

CARDOSO, E.L.; FERREIRA, R.M.A.; PEREIRA, T.A.; CARDOSO, M.M.F. Cultivo de peixes em tanques-rede: EPAMIG/IEF. In: CARDOSO, E. L e FERREIRA, R.M.A (Editores). Cultivo de peixes em tanques-rede: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável. **EPAMIG**, Minas Gerais. p.9-22, 2005.

CHEN, S.C.; TUNG, M.C.; CHEN, S.P.; TSAI, J.F; WANG, R.S.; CHEN, S.C.; ADAMS, A. Systematic granulomas caused by a *rickettsia*-like organism in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), from southern Taiwan. **Journal of Fish Diseases**, v.17, p.591-599.1994.

CHERN, R.S; CHAO, C.B. Outbreaks of a disease caused by *rickettsia*-like organism in cultured tilapias in Taiwan. **Fish Pathology**, v.29, p.61-71.1994.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.840-862. 2004.

COLQUHOUN, D.J.; DUODU, S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. **Veterinary Research**, p.42-47. 2011.

CREPALDI, D.V.; FARIA, P.M.C.; TEIXEIRA, E.A.; RIBEIRO, L.P.; COSTA, A.P.C.; MELO, D.C.; CINTRA, A.P.R.; PRADO, S.A.; COSTA, F.A.A.; DRUMOND, M.L.; LOPES, V.E.; MORAES, V.E. A situação da aquacultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3/4, p.81-85. 2006.

CYRINO, J.E.; CONTE, L.; Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati (Eds.). AquaCiência 2004: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura. Jaboticabal: **Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática**, cap.12, p.151-171. 2006.

DEAN, A.G.; SULLIVAN, K.M.; SOE, M.M. Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. OpenEpi [Online]. 2013.. Disponível em: <http://www.OpenEpi.com>. Acesso em: 06 de abr. 2016.

DOLKEN, L.; SCHULLER, R.; DOLKEN, G. Quantitative detection of t(14-18)-positive cell by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. **Biotechniques**, v.6, p.1058-1064. 1998.

EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.322, n., p.178-183. 1990.

ELLIS, T.; NORTH, B.; SCOTT, A. P.; BROMAGE, N.R.; PORTER, M.; GADD, D. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v.61, n.3, p.493-531. 2002.

EL-SAYED, A.F.M. Environmental requirements. **Tilapia culture**, **CABI Publishing**, Cambridge, MA, USA, p.34-46. 2006.

ENGLAND. The Fish Site. Outubro, 2014. Disponível em: <http://www.thefishsite.com/articles/1956/health-challenges-in-tilapia-culture-in-brazil/>. Acesso em: 11 de abr. 2016.

ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, Washington, v.252, n.5013, p.1643-1651. 1991.

FAO. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). **World Review of fisheries and aquaculture, Part I**, p. 4. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>. Acesso em: 06 de jan. 2016.

FAO. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Global Aquaculture Production statistics database updated to 2013. [Online] Summary information. **Fisheries and Aquaculture Department**. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/Overviews/AquacultureStatistics2012.pdf>. Acesso em: 06 de abr. 2016.

FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection**, v.59, p.1091–1101.1996.

FARIA, R.H.S.; MORAIS, M.; SORANNA, M.R.G.S.; SALLUM, W.B. Manual de criação de peixes em viveiros. Brasília: **Codevasf**, 136p. 2013. Disponível em: <http://www.codevasf.gov.br/principal/publicacoes/publicacoes-atuais/manual-de-criacao-de-peixes-em-viveiros.pdf>. Acesso em: 23 de mar. 2016.

FDA -UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2016. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/ucm132954.htm>. Acesso em: 20 de jan. 2016.

FERREIRA, R.A.R.; CAVENAGHI, A.L.; VALINI, E.D.; CORRÊA, M.R.; NEGRISOLI, E.; BRAVIN, L.F.N., TRINDADE, M.L.B.; PADILHA, F.S. Monitoramento de fitoplâncton e microcistina no reservatório da UHE Americana. **Planta Daninha**, Viçosa, v.23, n.2, p.203-214. 2005.

FIGUEIREDO, H.C.P. **Enfermidades emergentes na tilapicultura**. VI AQUISHOW, 2015. Disponível em: <http://aquishow.org.br/wp-content/uploads/2015/09/Doenc%CC%A7as-Emergentes-Henrique-Figueiredo-Aquishow-2015.pdf>. Acesso em 15 de jan. 2016.

FUKUDA, Y.; OKAMURA, A.; NISHIYAMA, M.; KAWAKAMI, H.; KAMAISHI, T.; YOSHINGA, T. Granulomatosis of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum* caused by an intracellular bacterium. **Fish Pathology**, v.37, p.119-124. 2002.

FURLANETO, F. P. B.; AYROZA, D. M. M. R.; AYROZA, L. M. S. Custo e rentabilidade da produção de tilápia (*Oreochromis spp.*) em tanques-rede no Médio Paranapanema, estado de São Paulo, safra 2004/05. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.36, n.3, p.63-69, 2006.

GOOGLE EARTH, 2016. Disponível em: <https://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/>. Acesso em: 23 de mar. 2016.

GURGEL, J. J. S. Potencialidade do cultivo de tilápia no Brasil. In: Congresso Nordestino de Produção Animal, Anais... **Sociedade Nordestina de Produção Animal**. Fortaleza, p.345-352. 1998.

HALL, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98. 1999.

HSIEH, C. Y.; TUNG, M.C.; TU, C.; CHANG, C.D.; TSAI, S.S. Enzootics of visceral granulomas associated with *Francisella*-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.). **Aquaculture**, v.254, n.1-4, p.129-138. 2006.

HSIEH, C.; WU, Z.B.; TUNG, M.C.; TSAI, S.S. PCR and in situ hybridization for the detection and localization of a new pathogen *Francisella*-like bacterium (FLB) in ornamental cichlids. **Diseases of aquatic organisms**, v.75, n.1, p.29–36. 2007.

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

INNIS, M. A; GELFAND, D. H. Optimization on PCRs. In: INNIS, M. A. (Org.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1990. cap. 1.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. “**Produção Pecuária Municipal, 2014**”. Rio de Janeiro/RJ, v. 42, 39p. 2014. Publicado em 08 de out. 2015. Disponível em: [http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2014\\_v42\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf). Acesso em: 23 de mar. 2016.

ISHIKAWA, M.M.; PÁDUA, S.B.; SATAKE, F.; MARTINS, M.L.; TAVARES-DIAS, M. Identificação morfológica de organismos semelhantes à Anaplasmataceae em monócitos de surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, n.33, p.225-228. 2011.

JACOB, D.; WAHAB, T.; EDVINSSON, B.; PETERZON, A.; BOSKANI, T.; FARHADI, L.; BARDUHN, A.; GRUNOW, R.; SANDSTRO, G. Identification and subtyping of *Francisella* by pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. **Letters in Applied Microbiology**, v.53, p.592–595. 2011.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.2761–2764. 2007.

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

KLINGER-BOWEN, R.E.C.; TAMARU, C.S.; McGOVERN-HOPKINS, K.; FOX, B.K.; ANTONIO, N.L.; MOANA, J.B.; SOTO, E. Francisellosis in Tilapia. **Center for Tropical and Subtropical Aquaculture (CTSA) Publication #158**, 5pp. 2012. Disponível em: [http://www.ctsa.org/index.php/publications/ctsa\\_publications1](http://www.ctsa.org/index.php/publications/ctsa_publications1). Acesso em: 20 de jan. 2016.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, n.2-3, p.95-125. 2006.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação de tilápias – Parte 1. **Panorama da Aquicultura**, março/abril. 1999.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Editora Acqua Supre Comércio de Suprimentos para Aqüicultura Ltda. Jundiaí, 285 p. 2000.

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

KUBITZA, F. Produção de tilápias em tanques de terra: estratégias avançadas no manejo. **Panorama da aquicultura**, v.19, n.115, p.14-21, set./out. 2009.

KUBITZA, F.; CAMPOS, J. L.; ONO, E. A. Panorama da piscicultura no Brasil: Estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade. **Panorama da Aquicultura**, v.22, n.132, p.14-25, jul./ago. 2012.

KUBITZA, F.; CAMPOS, J. L.; ONO, E. A. Panorama da piscicultura no Brasil: A sanidade na piscicultura, do ponto de vista dos produtores e técnicos. **Panorama da Aquicultura**, v.33, n.136, p.16-26, jan./fev. 2013.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L.M.M. **Saúde e manejo sanitário na criação de tilápias em tanques-rede**. Editora Kubitza, 1ª. Edição, Jundiaí, SP, 293p. 2013.

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

LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., et al Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v.409, n.6822, p.860- 921. 2001.

LEAL, A.G.; TAVARES, G.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.13, n.3, p.5704-5712. 2014.

LEWIN, S.R.; VESANEN, M.; KOSTRIKIS, L.; HURLEY, A.; DURAN, M.; ZHANG, L.; HO, D.D.; MARKOWITZ, M. Use of real-time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. **Journal of Virology**, v.73, p.6099-6103. 1999.

LIFE TECHNOLOGIES. 2014. Basics of real - time PCR. Real time PCR Handbook. Disponível em: <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>. Acesso em: 10 de abr. 2016.

LIMA, L.C. **Doenças de importância econômica em piscicultura**. VII Seminário de Aves e Suínos – AveSui, Regiões 2007 III Seminário de Aqüicultura, Maricultura e Pesca. 16p. 2007. Disponível em: [http://www.amordepeixe.com.br/download/Doencas de Importancia Economic a em Piscicultura.pdf](http://www.amordepeixe.com.br/download/Doencas_de_Importancia_Economic_a_em_Piscicultura.pdf). Acesso em: 23 de abr. 2016.

LIN, Q.; LI, N.; FU, X.; HU, Q.; CHANG, O.; LIU, L.; ZHANG, D.; WANG, G.; SAN, G.; WU, S. An outbreak of granulomatous inflammation associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in China. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v.33, p.1-7. 2015.

LONGHI, E.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; MULLER, E.E. Avaliação da eficácia de vacina autóctone de *Streptococcus agalactiae* inativado aplicada por banho de imersão em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.6, p.3191-3200. 2012.

MARTINS, A.M.C.R.P.F.; CATROXO, M.H.B.; HIPOLITO, M. *Francisella* spp.: a bactéria emergente responsável por massiva mortalidade na aquicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**. p. 216. 2015.

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

MAUEL, M.J.; SOTO, E.; MORALIS, J.A.; HAWKE, J. A *piscirickettsiosis*-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.9, p.27-34. 2007.

MAXAM, A. M. A New Method for Sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, n.2, p.560-564. 1977.

MIKALSEN, J.; COLQUHOUN, D. J. *Francisella asiatica* sp. nov. isolated from farmed tilapia (*Oreochromis* sp.) and elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* to species rank as *Francisella noatunensis* comb. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, September 25. 2009.

MIKALSEN, J.; OLSEN, A.B.; TENGS, T.; COLQUHOUN, D.J. *Francisella philomiragia* subsp *noatunensis* subsp nov isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L). **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.1960-1965. 2007.

MOCELLIN, S.; ROSSI, C.R.; PILATI, P.; NITTI, D.; MARINCOLA, F.M. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. **Trends of Molecular Medicine**, v.9, n.5, p.189-195, 2003.

MONTGOMERY, D. C. **Introduction to statistical quality control**. 7<sup>th</sup> Edition. USA: John Wiley & Sons, Inc. 2013.

NGUYEN, V.V.; DONG, H.T.; SENAPIN, S.; PIRARAT, N.; RODKHUM, C. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, an emerging bacterial pathogen affecting cultured red tilapia (*Oreochromis* sp.) in Thailand. **Aquaculture Research**, p.1-6. 2015.

NICO, L.G.; NEILSON, M.; LOFTUS, B. 2016a. *Tilapia rendalli*. USGS Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL. Disponível em: <http://nas.er.usgs.gov/queries/factsheet.aspx?SpeciesID=483>. Última revisão: 15 de mar. 2012. Acesso em: 10 de abr. 2016.

NICO, L.G.; FULLER, P.; NEILSON, M. 2016b. *Oreochromis aureus*. USGS Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL. Disponível em: <http://nas.er.usgs.gov/queries/factsheet.aspx?SpeciesID=463>. Última revisão: 19 de jun. 2013. Acesso em: 10 de abr. 2016.

NOGA, E. J. **Fish disease: diagnosis and treatment**. 2 ed, St Louis: Mosby-Year Book, 2010.

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

NORTH, B. P.; TURNBULL, J. F.; ELLIS, T., PORTER, M. J.; MIGAUD, H.; BRON, J.; BROMAGE, N. R. The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.255, p.466-479, 2006.

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

OLIVEIRA, E.G.; SANTOS, F.J.S.; PEREIRA, A.M.L.; LIMA, C.B. Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria. **Circular técnica**, n.45, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Teresina, PI, p.1-11. 2007.

OLIVEIRA, T.F.; SOUZA, L.X.; TAVARES, G.C.; FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Primeiro relato e diversidade genética de amostras de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isoladas de surtos em fazendas de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **XIII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos**. 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/26614696>. Acesso em: 05 de jan. 2016.

ORLANDO, C.; PINZANI, P.; PAZZAGLI, M. Developments in quantitative PCR. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.36, n.5, p.255-269. 1998.

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

OTTEM, K.F.; NYLUND, A.; KARLSBAKK, E.; FRIIS-MØLLER, A.; KROSSØY, B.; KNAPPSKOG, D. New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). **Archives of Microbiology**, v.188, p.547–550. 2007.

OTTEM, K.F.; NYLUND, T.E.; ISAKSEN, K.; BERGH, Ø. Occurrence of *Francisella piscicida* in farmed and wild Atlantic cod, *Gadus morhua* L., in Norway. **Journal of Fish Diseases**, v.31, p.525-534. 2008.

OTTEM, K.F.; NYLUND, A.; KARLSBAKK, E.; FRIIS-MØLLER, A.; KAMAISHI, T. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.231-1243. 2009.

PAUDEL D.; JARMAN R, LIMKITTIKUL K, KLUNGTHONG C, CHAMNANCHANUNT S, NISALAK A, et al. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. **North American Journal of Medical Sciences**, v.3, n.10, p.478-485. 2011.

PÉREZ LJ, DÍAZ DE ARCE H, TARRADAS J, ROSELL R, PERERA CL, MUÑOZ M, et al. Development and validation of a novel SYBR Green real-time RT-PCR assay for the detection of classical swine fever virus evaluated on different real-time PCR platforms. **Journal of Virological Methods**, Jun; v.174, n.1-2, p.53-59. 2011.

RAMOS-PAYÁN, R.; AGUILAR-MEDINA, M.; ESTRADA-PARRA, S.; GONZÁLEZ-y-MERCHAND, J.A.; FAVILA-CASTILLO, L.; MONROY-OSTRIA, A.; ESTRADA-GARCIA, I.C.E. Quantification of cytokine gene expression. Using a economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR® Green. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.57, p.439-445. 2003.

RAZAK, N. **Alien fish species in malaysian waters**. 2014. Disponível em: <http://www.fishyology.com/2014/04/alien-fish-species-22-apr-2014.html>. Acesso em: 10 de abr. 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. 2011.

ROCHA, I.; RODRIGUES, J. A aquicultura e a oferta mundial de proteína de origem animal. **Associação Brasileira de Criadores de Camarão**. Postado em 5 de mar. 2015. Disponível em: <http://abccam.com.br/site/a-aquicultura-e-a-oferta-mundial-de-proteinas-de-origem-animal/>. Acesso em: 10 de abr. 2016.

ROMANO, L.A.; SAMPAIO, L.A.; TESER, B.M. Micobacteriose por *Mycobacterium marinum* em “linguado” *Paralichthys orbignyanus* e em “barber goby” *Elacatinus figaro*: diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.254-258. 2012.

RUANE, N.M.; BOLTON-WARBERG, M.; RODGER, H.D.; COLQUHOUN, D.J.; GEARY, M.; McCLEARY, J.; O’HALLORAN, K.; MAHER, K.; O’KEEFFE, D.; MIRIMIN, L.; HENSHILWOOD, K.; GEOGHEGAN, F.; FITZGERALD, R.D. An outbreak of francisellosis in wild-caught Celtic Sea Atlantic cod, *Gadus morhua* L., juveniles reared in captivity. **Journal of Fish Diseases**, v.38, p.97-102. 2015.

RYAN, K.J.; RAY, C.G. **Sherris Medical Microbiology**. 4th ed. McGraw Hill. p.488-490. 2004.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, n.4839, p.487-491. 1988.

SAMBROOK, J.; GREEN, M.R. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2012.

SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, C.A.; HUTCHISON, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, v.24, n.265, p.687-695. 1977.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v.94, n.3, p.441-448. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1100841>. Acesso em: 15 de abr. 2016.

SCHEINERT, P.; BEHRENS, B.; KAHLE, D. Optimizing DNA Amplification Protocols using the Eppendorf® Mastercycler® . Eppendorf North America, Apr. 8. 2003. Disponível em: [http://www.eppendorfna.com/applications/PCR\\_appl\\_protocolsMC.asp](http://www.eppendorfna.com/applications/PCR_appl_protocolsMC.asp)> Acesso em: 13 de abr. 2016.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature Protocols**, v.3, n.6, p.1101-1108. 2008.

SCHRALLHAMMER, M.; SCHWEIKERT, M.; VALLESI, A.; VERNI, F.; PETRONI, G. Detection of a Novel Subspecies of *Francisella noatunensis* as Endosymbiont of the Ciliate Euplotes raikovi. **Microbial Ecology**, v.61, p.455–464. 2011.

SCHROEDER, G.L. Stable isotope ratios as naturally occurring tracers in the aquaculture food web. **Aquaculture**, v.30, p.203-210. 1983.

SEEGERS, L. *Tilapia rendalli*.1999. Disponível em: <http://www.fishbase.org>. Acesso em: 10 de abr. 2016.

SOTO, E.; HAWKE, J.P.; FERNANDEZ, D.; MORALES, J.A. *Francisella* sp. an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. **Journal of Fish Diseases**, v.32, p.713-722. 2009a.

SOTO, E.; FERNANDEZ, D.; HAWKE, J.P. Attenuation of the fish pathogen *Francisella* sp by mutation of the iglC\* gene. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.21, p.140-149. 2009b.

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

SOTO, E.; BAUMGARTNER, W.; WILES, J.; HAWKE, J.P. *Francisella asiatica* as the causative agent of piscine francisellosis in cultured tilapia (*Oreochromis* sp.) in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, p.821-825. 2011.

SOTO, E.; ILLANES, O.; HILCHIE, D.; MORALES, J.A.; SUNYAKUMTHORN, P.; HAWKE, J.P.; GOODWIN, A.E.; RIGGS, A. ; YANONG, R.P.; POUDE, D.B.; FRANCIS-FLOYD, R.; ARAUZ, M.; BOGDANOVIC, L.; CASTILLO-ALCALA, F. Molecular and immunohistochemical diagnosis of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, n.5, p.840-845. 2012.

SOTO, E.; McGOVERN-HOPKINS, K.; KLINGER-BOWEN, R.; FOX, B.K.; BROCK, J.; ANTONIO, N.; WAAL, Z.; RUSHTON, S.; MILL, A.; TAMARU, C.S. Prevalence of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in cultured tilapia on the island of Oahu, Hawaii. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.25, n.2, p.104-109. 2013a.

SOTO, E.; KIDDA, S.; MENDEZA, S.; MARANCIK, D.; REVANA, F.; HILCHIE, D.; CAMUS, A. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* pathogenesis analyzed by experimental immersion challenge in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Veterinary Microbiology**, v.164, p.77-84. 2013b.

SOTO, E.; BROWN, N.; GARDENFORS, Z.O.; YOUNT, S.; REVAN, F.; FRANCIS, S.; KEARNEY, M.T.; CAMUS, A. Effect of size and temperature at vaccination on immunization and protection conferred by a live attenuated *Francisella noatunensis* immersion vaccine in red hybrid tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v.41, n.2, p.593-599. 2014.

SOTO, E.; HALLIDAY-SIMMONDS, I.; FRANCIS, S.; KEARNEY, M.T.; HANSEN, J.D. Biofilm formation of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. **Veterinary Microbiology**, v.181, p.313-317. 2015.

SOUZA, S.M.G.; MATHIES, V.D.; FIORAVANZO, R.F. *Off-flavor* por geosmina e 2-Metilisoborneol na aquicultura. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.2, p.835-846. 2012.

STIASNY, M.L.J. 2003. Disponível em: <http://www.fishbase.se/Photos/PicturesSummary.php?StartRow=2&ID=2&what=species&TotRec=18>

TANIGUCHI, F.; KATO, H.C.A.; TARDIVO, T.F. A. Definições e estrutura Tanque-rede. **EMBRAPA Pesca e Aquicultura**. Projeto Peixe +. Out. 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1002743/definicoes-e-estrutura-tanque-rede>. Acesso em: 23 de mar. 2016.

TAVARES, G. C.; PALHARES, M. M. Epidemiologia, diagnóstico e controle das principais bacterioses que afetam a tilapicultura no Brasil. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**. Ano XXI, Jul./ago./set. 2011.

TAYLOR, C.; FORD, K.; CONNOLLY, B.A.; HORNBY, D.P. Determination of the order of substrate addition to MspI DNA methyltransferase using a novel mechanism-based inhibitor. **The Biochemical Journal**, London, v.291, n.2, p.493-504, Apr. 15. 1993.

TOENSHOFF, E.R.; KVELLESTAD, A.; MITCHELL, S.O.; STEINUM, T.; FALK, K.; COLQUHOUN, D.J.; HORN, M. A novel betaproteobacterial agent of gill epitheliocystis in seawater farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Plos One** 7, e32696. 2012.

TUCKER, S. *Off-flavor* problems in aquaculture. **Reviews in Fisheries Science**. Philadelphia, v.8, n.1, p.45-88. 2000.

UNITED STATES FISH AND WILDLIFE SERVICE. Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Ecological Risk Screening Summary. 2011. Disponível em: <https://www.fws.gov/Fisheries/ANS/erss/highrisk/Oreochromis-mossambicus-ERSS-revision-July-2015.pdf>. Acesso em: 20 mar.2016.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v.39, n.1, p.75-85. 2005.

VELASCO, A.J.; GÓMEZ, J.R.; AGIRRE, X.; BARRIOS, M.; NAVARRO, G.; ENÉRIZ, E.S.J.; CORDEU, L.; GÁRATE, L.; CASTILLEJO, J.A.; PROSPER, F.; TORRES, A.; HEINIGER, A.I. PCR en tiempo real, una nueva herramienta para la toma de decisiones clínicas. **Haematologica edición española**, v.91, n.1, p.27-34. 2006.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O. et al. The sequence of the human genome. **Science**, New York, N.Y., v.291, n.5507, p.1304-1351. 2001.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v.39, n.1, p.75-85. 2005.

ZANOLO, R.; YAMAMURA, M. H. Parasitas em tilápias do Nilo criadas em sistema de tanques-rede. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.27, n.2, p. 281-288, abr./jun. 2006.

ZANIBONI-FILHO, Evoy. Piscicultura das espécies exóticas de água doce. In: POLI. **Aquicultura Experiências Brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, p. 309-336. 2004.

## **CAPÍTULO II: ARTIGOS CIENTÍFICOS**

Título do manuscrito:

**Prevalence of *Francisella* spp. in *Oreochromis niloticus* cultivated in cages system**

Revista que receberá o manuscrito:

**Journal of Fish Diseases**

**ISSN: 1365-2761**

**DOI: 10.1111**

Site: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2761](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2761)

**Journal of Fish Diseases**

### **Author Guidelines**

*Journal of Fish Diseases* accepts manuscripts electronically via an online submission site, ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central). Authors should submit manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jfd>. Complete instructions for submitting manuscripts online are provided at the submission site. The review process is entirely electronically-based.

### **CONTACTS AND QUICK LINKS**

Contact the Editorial Office

Contact the Production Editor

Submit your manuscript now to the Journal of Fish Diseases

[Click here to download the Colour Work Agreement Form](#)

[Guidelines for Electronic Graphics](#)

## **EDITORIAL POLICY**

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley Blackwell's publication ethics policies, which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the Committee on Publication Ethics.

### **Authorship**

Qualification for authorship should comprise:

- substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data; drafting or critically revising the manuscript; and
- approval of the final submitted version.

All authors must satisfy all three criteria. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck™ software employed by the Journal.

### **Funding**

Authors must disclose all sources of funding for their research and its publication. This information should be included in the cover letter. Any involvement of the funder in study design, data collection, data analysis, manuscript preparation and publication decision should be clearly stated in the cover letter.

### **Conflict of interest disclosure**

*Journal of Fish Diseases* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly

relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Editors, in the manuscript (in the Acknowledgments section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

## **MANUSCRIPT SUBMISSION & PRESENTATION**

### **Article Types**

#### **Original Manuscripts**

Manuscripts should be structured in the following format: Title Page; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; References; Tables and Figures. All Original Manuscripts will be fully peer reviewed prior to publication.

#### **Reviews**

The *Journal of Fish Diseases* welcomes Review papers. Such Reviews can cover any subject within the journal's remit. Review papers will be fully peer reviewed prior to publication. Prospective authors are encouraged to review their ideas and raise any questions with a member of the Editorial Team should they wish.

Reviews should define the present level of understanding of their subject and suggest new insights or possible avenues for future investigation. The text should be produced on the same editorial basis as Original Manuscripts in the *Journal of Fish Diseases*.

Colour illustrations in Review Articles will be reproduced free of charge, both online and in print.

## **Short Communications**

These should differ from full papers on the basis of scope or completeness, rather than quality of research. They may report significant new data and new findings arising from problems with narrow, well-defined limits, or important findings that warrant rapid publication before broader studies are complete. Their text should neither exceed 1500 words (approximately 6 pages of typescript) nor be divided up into conventional sections. When submitting Short Communications, authors should make it clear that their work is to be treated as such.

Short Communications will be editorially reviewed within the Editorial Team and/or Editorial Board in order to facilitate rapid publication.

## **Clinical Reports**

We also welcome the submission of Clinical Reports on new conditions improvements in clinical diagnosis and new treatments. Clinical Reports will be editorially reviewed within the Editorial Team and/or Editorial Board in order to facilitate rapid publication.

## **Manuscript Format**

The manuscript should be uploaded as a Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file and should be typed with double spacing on one side of the paper on A4, or similar, paper (297 × 210 mm), with generous margins. Pages should be numbered consecutively in Arabic numerals, including those of acknowledgements, references, tables and figure legends.

## **Title Page**

A title page should contain the full title, author's name(s) and place of work, address for correspondence (including email) and short running title.

## **Abstract**

The text must be preceded by a short abstract not exceeding 200 words, followed by no more than six keywords.

## Figures and Tables

Tables, figure legends (including magnifications) and acknowledgements should be submitted on separate sheets, and appear at the end of the manuscript, after the references. Tables and figures should be referred to in the text together with an indication of their appropriate position recorded in the text margin.

## Latin Names, Authority, and Disposition

The full Latin specific name, including the authority with correct taxonomic disposition, should appear at least once for each species when first mentioned in the text or elsewhere, thus: Atlantic salmon, *Salmo salar* L., turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), snakehead, *Channa punctatus* (Bloch), rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), i.e. authorities bracketed depending on first description (for further information see American Fisheries Society Special Publication No 12, *A List of Common and Scientific Names of Fishes from the United States and Canada* or [www.fishbase.com](http://www.fishbase.com)).

## References and Citations

The reference list should be in alphabetical order and include the full title thus:

Chapman D.W. (1971) Production. In: *Methods for the Assessment of Fish Production in Freshwater* (ed. by W. E. Ricker), pp. 199-214. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Wickens J.F. (1972) The food value of brine shrimp, *Artemia salina* L., to larvae of the prawn, *Palaemon serratus* Pennant. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **10**, 151-170.

References in the text should use the Harvard System and be in full on first mention, e.g. (Brown, Smith & Williams 1975), subsequently abbreviated to (Brown *et al.* 1975). Authors are responsible for the accuracy of their references. References should only be cited as 'in press' if they have been accepted for

publication. Manuscripts in preparation, unpublished reports and reports not readily available should not be cited. Personal communications should be cited as such in the text.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

### **Units and spelling**

Spelling should conform to *The Concise Oxford Dictionary of Current English*. Units of measurement, symbols and abbreviations must be given in metric units but British or other equivalents may be included in parentheses. Where any doubt arises as to the correct abbreviations, reference should be made to *Quantities, Units and Symbols*, 2nd edition, 1975, published by the Royal Society, London (ISBN: 0 85403 071 9). Full stops are not used with abbreviations. The following are suggested as internationally accepted units: %, °C, mm, cm, cc, mL, L, m, km, mg, g, kg, s, min, h, ha.

For sample issue please click here.

Systeme International (SI) units should be used. The salinity of sea water should be given as gL<sup>-1</sup>. Use the form gL<sup>-1</sup> not g/ml. Avoid use of g per 100 g, for example in food composition, use g kg<sup>-1</sup>. If other units are used, these should be defined on first appearance in terms of SI units, e.g. mmHg. Abbreviations of chemical and other names should be defined when first mentioned in the text unless they are commonly used and internationally known and accepted.

Scientific Names and Statistics: Complete scientific names, including the authority with correct taxonomic disposition, should be given when organisms are first mentioned in the text. Complete scientific names, but without the authority, should also be given when organisms are first mentioned in tables, figures and keywords.

## **Illustrations**

Guidelines to submitting illustrations will be found at the submission site. We would like to receive your artwork in electronic form. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS), and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File Format (TIFF). Ideally, vector graphics that have been saved in metafile (.WMF) or pict (.PCT) format should be embedded within the body of the text file. Detailed information on our digital illustration standards is available here. Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse. Tables are part of the text and should be included, one per page, after the References.

All graphs, drawings, and photographs are considered figures and should be sequentially numbered with Arabic numerals. All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction. Submit high resolution files of each illustration. Line drawings should be professionally drafted and photographed; halftones should exhibit high contrast. Incorporate linear size scale when relevant.

## **Supporting Information** (if applicable)

Authors wishing to submit supporting information (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies or any other material for which there is insufficient space in the print edition of the Journal) must do so at the time of first submission. This supporting information is an integral part of the article and will be reviewed accordingly. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material.

## **Language**

The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscripts are professionally edited. A list of independent

suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication. Manuscripts in which poor English makes it difficult or impossible to review will be returned to authors without review.

### **Electronic Submission**

Authors must submit their manuscripts electronically to <http://mc.manuscriptcentral.com/jfd> via their Author Centre. Complete instructions for preparing and submitting manuscripts online are provided at the submission site. Authors are notified promptly by e-mail that their manuscripts have been received. If this acknowledgement is not received within a week or so then authors should enquire at the Editorial Office: [JFDeditorialoffice@wiley.com](mailto:JFDeditorialoffice@wiley.com). The main author is responsible for entering details of any co-authors into the system when prompted. Authors should retain one copy of text, tables and illustrations as the Editors cannot accept responsibility for damage or loss of manuscripts. Overseas authors may wish to consult an appropriate member of the Editorial Board prior to submission of material.

### **Cover letter**

The cover letter should disclose any potential sources of conflict of interest that Editors may consider relevant to their manuscript.

### **Suggesting reviewers**

Authors are invited to suggest at least two reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them.

Authors also have the option of suggesting potential reviewers whom they would prefer not be selected. If this option is chosen, the reason(s) must be stated

in the cover letter, or your request will not be considered. If the reason involves a conflict of interest, this should be explained. Please note: The Associate Editor will consider but not guarantee to honour such requests

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Copyright and Licencing**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

#### **For authors signing the copyright transfer agreement**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions

[http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp).

#### **For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements.

For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

### **OnlineOpen**

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see here.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website here.

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

### **Colour Work Agreement**

The author must pay for colour illustrations at a rate quoted by the publisher. In the event that the author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Journal of Fish Diseases* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the

appropriate documentation is completed for the Publisher. To download a Colour Work Agreement Form, [click here](#).

The form must only be returned by mail or courier, to the following address;

Customer Services (OPI)

John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre

New Era Estate

Oldlands Way

Bognor Regis

West Sussex

PO22 9NQ

Note: Any colour illustrations used in Review Articles will be free of charge.

Any article (other than Reviews) received by Wiley Blackwell with coloured images will not be published until the form has been returned.

### **Proofs**

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

### **Early View**

*Journal of Fish Diseases* is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as

soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been reviewed in accordance with the author guidelines, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

## **Offprints**

Authors will be provided with electronic offprints of their paper. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields. If you have queries about offprints, please email: [offprint@cosprinters.com](mailto:offprint@cosprinters.com)

The cost is more if the order form arrives too late for the main print run. Offprints are normally dispatched within 3 weeks of publication of the issue in which the paper appears. Please contact the publishers if offprints do not arrive: however, please note that offprints are sent by surface mail, so overseas orders may take up to 6 weeks to arrive. Electronic offprints are sent to the first author at his or her first email address on the title page of the paper, unless advised otherwise; therefore please ensure that the name, address and email of the receiving author are clearly indicated on the manuscript title page if he or she is not the first author of the paper.

## **Author Services**

Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically

added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit [here](#) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

### **Author material archive policy**

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Editorial Office or Production Editor as soon as possible if you have not already done so.

### **Acknowledgment to our Referees**

No academic journal can operate without the generous support of its referees. We wish to thank all of you who have helped us with the peer review process over the years. Without this support, all scientific standards are placed in jeopardy. We also hope that our enhanced journal will encourage you to continue to offer your quality papers to us for review. With your help, we will be striving to ensure that as it moves into its second quarter century, the *Journal of Fish Diseases* will continue to be the automatic choice for quality papers in fish and shellfish pathology.

1 Prevalence of *Francisella* spp. in *Oreochromis niloticus* cultivated in cages system

2

3 F Raghianti<sup>1\*</sup>, M M Ferrasso<sup>1</sup>, M V Rodrigues<sup>2</sup>, E A Santos<sup>3</sup>, R F S Pereira<sup>4</sup>, J P Araújo

4 Júnior<sup>2</sup>, O A Martins<sup>1</sup>, G F Biondi<sup>1</sup>

5

6 <sup>1</sup>College of Veterinay Medicine and Animal Science of University of the State of São

7 Paulo (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil. \*E-mail: raghiante@gmail.com

8 <sup>2</sup>Institute of Biosciences, University of the State of São Paulo (UNESP), Botucatu, São

9 Paulo, Brazil.

10 <sup>3</sup>Federal Institute of Education, Science and Technology of Triangulo Mineiro (IFTM),

11 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

12

13 <sup>4</sup>Terra Certifications and Agricultural Consulting, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

## 27 **Abstract**

28 Francisellosis in fishes can cause serious economic losses to producers. The aim of this  
29 research was to estimate the prevalence of *Francisella* spp. in *Oreochromis niloticus*  
30 grown in cages system. It was collected randomly 150 spleen samples of *Oreochromis*  
31 *niloticus* from three different slaughterhouses at Triangulo Mineiro, Brazil. It was  
32 measured the fishes sizes (cm) and the body mass (g). Before the collection of the spleen,  
33 the sex of the fishes was identified. The spleen was used to identify the *Francisella* spp.  
34 by qPCR method. The female showed a body mass and significantly smaller size  
35 ( $p < 0.0001$ ) when compared with males. It was not observed a significant relationship,  
36 between these variables with the presence of bacterium ( $p > 0.05$ ). The qPCR results  
37 identified *Francisella* spp. in six samples, representing a prevalence of 4 %. The  
38 sequencing of the gene *iglC* belonging to the 16S ribosomal RNA identified the presence  
39 of *Francisella noatunensis* subspecies *orientalis* in the evaluated samples. This  
40 prevalence finding may lead to the establishment, from government departments,  
41 monitoring behavior of francisellosis cases in Brazil, due to major economic losses  
42 generated by its etiological agent.

43

44 **Key words:** francisellosis, diagnosis, qPCR, aquaculture health.

45

## 46 **Introduction**

47 In the last five decades, the global fish production from both mining and fishing  
48 as aquaculture has increased, with China being the largest producer of fish. (FAO 2014).  
49 In this context, Brazil occupies the 17<sup>th</sup> place in the ranking in aquaculture and the 25<sup>th</sup>  
50 position in the extractive fishing (Brasil 2010). In relation only to continental production,  
51 Brazil is in 9<sup>th</sup> place, reaching produce 388,700 tons, equivalent to 0,9 % of total

52 production, while China is the absolute leader with a production of 24,817,311 tons, what  
53 means 60,1 % from the world production of continent world fish (FAO 2015a).

54 In Brazil, the State of Minas Gerais is the second largest producer in Southeast,  
55 behind the State of São Paulo (Brasil 2011). Tilapia (*Oreochromis* spp.), including all  
56 species, is the second most important group of fish in the world and the most widely  
57 grown, with higher production potential aimed at human consumption. Is second only  
58 to carp (*Cyprinus carpio*) that has ornamental purpose (FAO 2015b).

59 The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the main species cultivated in the  
60 country, mainly due to its precocity, easy adaptation to different types of environment  
61 and farming systems, excellent growth rates and great consumer acceptance (Tavares &  
62 Palhares 2011; Kubitza 2012).

63 In the region of Triangulo Mineiro – Minas Gerais – Brazil, there is no estimate  
64 volume production of *O. niloticus*, since 90 % of fish farmers operating in illegality  
65 (Brasil 2016). This lack of supervision creates misinformation regarding the possible  
66 pathogens that may be present in these crops.

67 One of the major obstacles aquaculture is the population density in relation to the  
68 creation of area it provides higher concentrations of organic matter, algae development  
69 and other microorganisms that cause environmental and animal impact. Therefore, in  
70 breeding where there is no water quality, fishes suffer stress and become suitable to  
71 develop various infections. Among the most frequent pathogens in fish farming, there are  
72 the bacteria that cause major economic and health damages.

73 Several bacteria can infect farmed fish, and those belonging to genus *Francisella*  
74 has been widely studied due to its emerging feature. This microorganism is classified in  
75 Frascicellaceae family and are gram-negative coco-bacilli, intracellular parasites,  
76 facultative anaerobic, non-spore forming. They are typically positive catalase and  
77 cytochrome oxidase negative, with growth between 15°C and 22°C in vitro, depending on

78 the species (Soto, Illanes, Hilchie, Morales, Sunyakumthom, Hawke, Goodwin, Riggs,  
79 Yanong, Pouder, Francis-Floyd, Arauz, Bogdanovic & Castillo-Alcala 2012; Martins,  
80 Catroxo & Hipolito 2015).

81 In fish, the francisellosis may manifest acutely, with discrete clinical signs, but with  
82 a high mortality rate, as a subacute or chronic infection, with nonspecific symptoms such  
83 as anorexia, erratic swimming, anemia and exophthalmia. During the necropsy it is also  
84 possible to observe focal hemorrhagic areas, loss of scales, erosion in the epidermis,  
85 nephromegalia and splenomegaly. (Soto, Fernandes & Hawke 2009a; Soto, Hawke,  
86 Fernandes & Morales 2009b; Martins *et al.* 2015).

87 Internally, it is possible to observe more specific lesions of the disease and the  
88 presence of mainly whitish nodules in the spleen and kidneys, and occasionally, in the  
89 liver and in the heart. Such lesions are characterized by the large amount of  
90 coccoblasts that accumulate in the cell cytoplasm, causing focal and diffuse  
91 necrotizing vasculitis, resulting in granuloma formation. (Mauel, Soto, Morales & Hawke  
92 2007; Soto *et al.* 2012).

93 The identification of bacterial diseases in fish is performed by checking the  
94 clinical signs, bacterium isolation, biochemical and molecular techniques, such as  
95 Polymerase Chain Reaction (PCR), especially Real-Time PCR, followed by methods  
96 based on sequence analysis of 16S ribosomal subunit rRNA. (Janda & Abbott 2007).

97 To date, no commercial vaccines are available for the prevention of francisellosis  
98 in fish (Soto, Brown, Gardenfors, Yount, Revan, Francis, Kearney & Camus 2014). The  
99 control and prevention of this disease in *O. niloticus* in Brazil are conducted in the form  
100 of implementation of good practices in the production and health management. (Kubitza  
101 2008).

102 Given the deficiency in *O. niloticus* production data in the region of Triangulo  
103 Mineiro, Minas Gerais, Brazil, together with illegal activity and misinformation regarding

104 the health of farmed fish, diseases like francisellosis may have been underreported,  
105 causing serious losses to the producers. The aim of this research was to estimate the  
106 prevalence of *Francisella* spp. and evaluating whether fish sex and size influence on the  
107 infection rate of this microorganism.

108

## 109 **Materials and Methods**

110

### 111 **Ethic**

112 This study followed the ethical principles in animal research and it was approved  
113 by Ethics Committee on Animal Use (ECUA), College of Veterinay Medicine and  
114 Animal Science of University of São Paulo State (UNESP), Botucatu, Campus, São  
115 Paulo, Brazil, as attested referred to protocol number 09/2016.

116

### 117 **Sampling**

118 The sample collecting was dine at Hydrographic Basin on Araguari River, located  
119 at mesoregion of Triangulo Mineiro, in the western of Minas Gerais State – Brazil,  
120 between the geographical coordinates 19°35'21.67" on South latitude and 44°39'16.44"  
121 on Greenwich west longitude, which occupies an area of 20,186 square kilometers,  
122 covering part of 20 counties (Brito & Rosa 2003).

123 Based on researches about *O. niloticus* health, at Biotechnology laboratory of  
124 University of São Paulo State (UNESP) at Botucatu – São Paulo – Brazil, it was noted  
125 the presence of 10 % of *Francisella* spp. (Rodrigues, MV – personal communication).  
126 This percentage was used to set the number of animals to be sampled. This way, for  
127 calculating the samples number it was used the website program OpenEpi (Dean, Sullivan  
128 &Soe 2013) and was selected the prevalence method (cross-sectional study). The

129 minimum sampling calculated to this kind of study was 139 animals with 95 % confidence  
130 interval. To avoid sampling errors, it was increased the value to 150 fishes.

131

### 132 **Obtaining Samples**

133         After stunning the animals on ice method approved by the Brazilian health  
134 legislation to ensure the welfare of fish to be slaughtered, the *O. niloticus* were randomly  
135 selected. The body mass (g) and length (cm) of the animals were measured. Then the  
136 fishes were necropsied as described by Noga (2010). Every macroscopic noted change  
137 and gender were listed in own spreadsheet for this purpose.

138         During the necropsy, 150 samples of *O. niloticus* spleen were collected from three  
139 different slaughterhouses (A,B,C), which receives fish from different fish farms, from  
140 Triangulo Mineiro region, Minas Gerais, inspected by Institute of Agriculture of the State  
141 of Minas Gerais. It was collected fifty individual samples of spleen in each  
142 slaughterhouse. Each establishment receives tilapia from different farms located in a  
143 distinct reservoir of hydroelectric plant, with three plants being all supplied by Araguari  
144 River, and all using the cages system.

145         After opening the coelomic cavity, the spleen was removed with the aid of a sterile  
146 scalpel blade, transferred to properly identified sterile tube and immediately packaged  
147 into an isothermal box with temperature of 4°C. At the laboratory, the samples were  
148 frozen in – 18°C and, after that, it was performed molecular assays.

149

### 150 **Polymerase chain reaction in real time and sequence by the Sanger method**

151         Samples were analyzed at the Biotechnology Institute Laboratory of UNESP, at  
152 Botucatu – São Paulo – Brazil. For DNA extraction, the spleen was weighed in new free  
153 tubes of nucleic acid 1,5 ml in an analytical balance up to 10 mg. Then, the tissue was  
154 macerated and subjected to DNA extraction with Genomic DNA Purification kit GeneJet

155 (Thermo Scientific) as the manufacturer's recommendations. Then, it was quantified and  
156 evaluated the correlations 260/280 to check the purity of the samples. The samples were  
157 used at concentration above 5 ng/ $\mu$ L and relation above 1.7. After DNA extraction, all  
158 the samples were subjected to qPCR for the detection of *Francisella noatunensis* subsp.  
159 *orientalis*. The pair of *primers* used to recognize the gene *iglC* from ribosomal region 16S  
160 and the expected size of product are listed in table 1.

#### 161 Table 1

---

162 The *mix* of qPCR reaction was made of 12.5  $\mu$ L, of goTaq qPCR Mastermix 2x  
163 (Promega®), 0.5  $\mu$ L (concentration 10.0 pmol/ $\mu$ L) of each *primer* (*iglC* forward and *iglC*  
164 reverse), 4.0  $\mu$ L of DNA extracted and 7.5  $\mu$ L of water free of nucleic acids. All the  
165 samples are related to 260/280 above of 1.7, extraction is not necessary. As positive  
166 control it was used DNA from Bacterium *Francisella noatumensis* subsp. *orientalis*  
167 previously identified, sequenced and characterized. (Rodrigues, MV – personal  
168 communication). For the qPCR achievement, it was made the initial denaturation at 95°C  
169 for 15 minutes, followed by 40 cycles during 15 seconds, 60°C for one minute. The  
170 reaction was done at the thermocycler Applied Biosystem 7500 Fast Real-time PCR  
171 Systems (Applied Biosystem/Life Technologies). For displaying the results it was  
172 analyzed the amplification and *melting* curves, comparing with positive and negative  
173 control.

174 Two positive samples in qPCR, coming from the slaughterhouses A and C were  
175 purified from the amplified using the Kit Illustra Microspin<sup>TMS</sup>-400 HR Columns Kit (GE  
176 Healthcare) according to manufacturers' recommendations. The sequencing was  
177 conducted by the Sanger method (Sanger, Air, Barrell, Brown, Coulson, Fiddes,  
178 Hutchison, Slocombe&Smith. 1977). Amplicons were sequenced using BigDye<sup>TM</sup>  
179 Terminator Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) in Applied Biosystem Cpillary  
180 3500 Genetic Analyser. The eletrograms quality was analyzed by Sequencing

181 Analyzerprogram version 5.4 (Applied Biosystem). After obtaining the sequences, they  
182 were lined as they were removed from the animals and created consensus on Bioedit  
183 Software version 7.2.5 (Hall, 1999). Subsequently, sequences were submitted to Gebank  
184 database for search of similarity with other sequences using the BLAST (Basic Local  
185 Alignment Search Tool) algorithm.

186

### 187 **Statistical Analysis**

188 The statistical study of the Nile tilapia gender, body mass and size was performed  
189 by Anova variance and complemented by the multiple comparison test of Kramer-Tukey.  
190 The chi-square test was used to determine the association between the prevalence of  
191 *Francisella* spp., gender and size of the analyzed fish. For the chi-square the Software R  
192 version 2.14.2 from Public Domain (R Development Core Team 2011) was used. The  
193 result of the *O. niloticus* gender, body mass and size were express as mean  $\neq$  standard  
194 error of mean statistical conclusions were made at 5 % of significance (Montgomery  
195 2013).

196

### 197 **Results**

198 The study showed that female fishes have the body mass (g) and size (cm)  
199 significantly smaller ( $p < 0.0001$ ) when compared to male (table 2).

#### 200 **Table 2**

---

201 Some lesions were identified on the evaluated fishes. Hepatomegaly was present  
202 in 21.33 % (32/150) of the fishes, splenomegaly at 4.16 % (5/150) and ulcer on the upper  
203 lips at 0.66 % (1/150). Front lesions observed during the necropsy came the chance to  
204 treat a bacterial infection. By the presence of splenomegaly was performed the qPCR for  
205 *Francisella* spp.

206 The gender and length were evaluated to check if these characteristics are risk  
207 factors for the development of francisellosis, it was not noted significance ( $p>0.05$ ) as  
208 data expressed in the table 3.

### 209 [Table 3](#)

---

210 From 150 fishes examined during necropsy, six were positive for *Francisella* by  
211 qPCR. At the table 4, it may be noted the prevalence of positive animals for *Francisella*  
212 spp. by qPCR.

### 213 [Table 4](#)

---

214 Among the analyzed samples, six were positive for *Francisella* spp. by qPCR  
215 testing, which corresponds to a prevalence of 4 %. The threshold cycle data and melting  
216 temperature of the positive samples, positive and negative controls are shown in table 5.

### 217 [Table 5](#)

---

218 Of the six positive samples, two were from slaughterhouse A, and four were from  
219 C. The amount of positive samples distributed by slaughterhouse, with their respective  
220 prevalence are described in table 6.

### 221 [Table 6](#)

---

222 The result of the sequencing for confirmation and identification of bacterial  
223 species found 98 % of similarity with the sequence of *Francisella noatunesis* subsp.  
224 *orientalis* FN001 strain, complete genome, access number CPO12153, confirming the  
225 species detected by qPCR.

226

## 227 **Discussion**

228 The proportion of *O. niloticus*, males and females, reported in the research shows  
229 that the amount of males (86 %) was higher than females (14 %). This is due to the sexual  
230 inversion process applied in production for population control. This fact associated with

231 homogeneity of the samples with regard to length, body mass and gender, explains the  
232 non-significance of these characteristics (table 3) as risk factors for francisellosis.

233         Among the observed lesions, multifocal granulomas were not observed in organs  
234 of the studied fishes, which suggests no association of this macroscopic injury to the  
235 presence of *Francisella* spp. Other studies have reported the correlation of *Francisella*  
236 spp. with granulomatous disease mainly in spleen and kidneys of *O. niloticus* (Mauel,  
237 Miller, Styer, Pouder, Yanong, Goodwin, & Schwedler 2005; Mauel *et al.* 2007; Soto *et*  
238 *al.* 2009a; Ottem, Nylund, Karlsbakk, Friis – Møller & Kamaishi 2009; Jeffery, Stone,  
239 Feist & Verner-Jeffreys 2010; Nguyen, Dong, Senapin, Pirarat & Rodkhum 2015; Lin,  
240 Li, Fu, Hu, Chang, Liu, Zhang, Wang, San & Wu 2015) such as in other fish species  
241 (Fukuda, Okamura, Nishiyama, Kawakami, Kamaishi .& Yoshinga 2002; Ostland,  
242 Stannard, Creek, Hedrick, Ferguson, Carlberg & Westerman 2006). It is noteworthy that  
243 although macroscopic granuloma were not observed, this injury can be observed by  
244 microscopy. However, this technique was not used in this research.

245         Another relevant factor is the fact that in this study the bacterium was isolated  
246 from mature fishes in the summer, where the age and water temperature are not  
247 predisposing factors for animal francisellosis. Oliveira, Souza, Tavares, Figueiredo &  
248 Leal (2014) in outbreak investigation in the states of Minas Gerais and São Paulo, during  
249 the years 2012-2014, submitted the *O. niloticus* with clinical symptoms to bacteriological  
250 examination and necropsies. The authors observed a higher frequency of the disease in  
251 winter periods with the water temperature below 22°C and the most susceptible animals  
252 were fingerlings, juveniles and youth adults. An important point is that although there  
253 was a low prevalence, it is shown that the bacteria remains in the environment and can  
254 infect animals with deficit immune system or solution continuity caused by management  
255 occasioned by trauma, fights or parasitism, causing serious damage for producers.

256           The qPCR for diagnosis of diseases in fish has been used to be a high specificity  
257 and sensitivity technique. In this study, it was observed that the melting curve had only  
258 one peak and in amplification was not seen positivity from the negative samples,  
259 demonstrating its specificity. Moreover, this technique provides rapid results and a  
260 relatively low cost to the producers. Several authors have applied this technique to the  
261 identification of *Francisella* spp. in fish (Ottem, Nylund, Isaksen & Bergh 2008;  
262 Birkbeck, Bordevik,, Froystad & Baklien 2011; Colquhoun & Duodu 2011; Jacob,  
263 Wahab, Edvinsson, Peterzon, Boskani, Farhadi, Barduhn, Grunow & Sandstro 2011;  
264 Oliveira *et al.* 2014; Ruane, Bolton-Warberg, Rodger, Colquhoun, Geary, McCleary,  
265 O'Halloran, Maher, O'Keeffe, Mirimin, Henshilwood, Geoghegan & Fitzgerald 2015),  
266 followed by sequencing 16s ribosomal RNA portion to *Francisella noatunensis* subsp.  
267 *orientalis* identification. (Nylund, Ottem, Watanabe, Karlsbakk. & Krossøy 2006; Olsen,  
268 Mikalsen, Rode, Alfjorden, Hoel, Straum-Lie, Haldorsen & Colquhoun 2006; Colquhoun  
269 & Duodu 2011; Oliveira *et al.* 2014; Nguyen *et al.* 2015; Ruane *et al.* 2015).

270           In qPCR reaction, the detection of fluorescence to a particular gene is proportional  
271 to the quantity of this gene at the sample, thus the higher the quantity of gene, earlier the  
272 fluorescence will be detected (Velasco, Gómez, Agirre, Barrios, Navarro, Enériz, Cordeu,  
273 Gárate, Castillejo, Prosper, Torres & Heiniger 2006), corroborating with the results of  
274 this study showed in table 5. Thus, it was possible to verify that the samples 2 and 6  
275 showed values of Ct lower and closer to positive control. It shows that these fishes were  
276 probably had a greater bacterial load than the other animals. This point is crucial to  
277 evaluate the degree of infection and its pathogenicity.

278           The diagnosis of francisellosis by qPCR followed by the sequence of region 16S  
279 RNAr has enable the identification of the following microorganisms: *Francisella*  
280 *tularensis* with 97 % of similarity, *Francisella philomiragia* with 98 % of similarity and  
281 99 % for other species of this type of bacteria. (Ostland *et al.* 2006; Mauel *et al.* 2007;

282 Mikalsen, Olsen, Tengs & Colquhoun 2007; Ottem, Nylund, Karlsbakk, Friis-  
283 Møller, Krossøy & Knappskog 2007; Soto *et al.* 2009a). A similar result was found in  
284 this study, where the diagnosis of francisellosis by qPCR followed by sequencing *iglC*  
285 gene 16S ribosomal identified *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* with 98 % of  
286 similarity.

287         The information contained in this study about the prevalence of francisellosis in  
288 tilapias from Minas Gerais State – Brazil is of great epidemiological importance for  
289 further effective definitions of prevention and control methods, since to this date, no  
290 studies reporting on the prevalence of the disease in fish in the country. Leal, Tavares &  
291 Figueiredo (2014) presented the first confirmed report of *Francisella noatunensis* subsp.  
292 *orientalis* in this country. However it was not an epidemiological research study. In the  
293 study, the authors evaluated 44 fishes (*O. niloticus*) fingerlings and juveniles as clinical  
294 symptomatology for francisellosis, grown in cages systems, from outbreaks described in  
295 five distinct regions of Minas Gerais State, Brazil.

296         According to Alfjorden & Ruane (2015), the prevalence of infected fish in a  
297 population can be high due to the fact of francisellosis is a chronic disease in nature and  
298 has a high infectivity. A study done by Soto, Kidda, Mendez, Marancik, Revana,  
299 Hiltchiea & Camus (2013) agreed with this statement, since, using the qPCR technique  
300 for diagnosis, the authors observed a high prevalence of *Francisella noatunensis* in  
301 *Oreochromis hornorum*, *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* in Hawaii. However, in  
302 this work it was observed relatively low prevalence, although when the production  
303 volume of *O. niloticus* cultivation is evaluated, it is known that the economic loss due to  
304 the mortality and the weight loss in gain are significant.

305         Another important factor is that due to the time that the detected francisellosis in  
306 this study is not be the most common for this microorganism, it can be concluded that  
307 this agent can remain in the environment, being a major problem for fish farming. This

308 fact is made clear by the study conducted by Soto *et al.* (2015), which indicated the  
309 biofilm formation of the bacteria within 24 hours after inoculation in a controlled  
310 environment, with water at different temperatures and salinity levels. These facts express  
311 the fundamental relevance of the study with regard to prevention practices to be applied  
312 by producers and technicians responsible in order to control the disease in their herds.

313         Effective practices for the control and prevention of *Francisella* spp. in *O.*  
314 *niloticus* crops involve basically the development of health monitoring fingerlings  
315 programs, strict control animal traffic, a continuous monitoring and maintenance of  
316 adequate water quality, proper nutrition and feeding, vaccine development in the  
317 medium term and laboratory tests routine even in apparently healthy lots (Kubitza 2008).

318         More studies on the prevalence of *Francisella* spp. in tilapia should be carried out  
319 in other regions of Brazil, in order to clarify the real situation of this microorganism in  
320 the breeding stock and the economic damage resulting from their presence, which will  
321 support for health authorities.

322

### 323 **Conclusion**

324         The results of this study indicates that the *Francisella noatunensis* subsp.  
325 *orientalis* is present in *O. niloticus* farms in the Triangulo Mineiro region, Minas Gerais,  
326 Brazil. The size and gender of fishes do not influence this microorganism infection rate.  
327 Even with the relatively low numerical prevalence, this finding may lead to the  
328 establishment by the government agencies, conducts surveillance of cases of  
329 francisellosis in the country due to significant economic losses generated by its etiologic  
330 agent in *Oreochromis niloticus* breeding farms.

331

332

333

334 **Acknowledgments**

335           Thanks to Biotechnology Laboratory of the UNESP, Botucatu campus – São  
336 Paulo – Brazil, for financial support for implementation of molecular tests. And also to  
337 the visited slaughterhouses owners by giving the samples.

338

339 **References**

340 Alfjorden, A. & Ruane, N. 2015. Francisellosis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.).  
341 *International Council for the Exploration of the Sea (ICES)* - Identification leaflets for  
342 diseases and parasites of fish and shellfish, Leaflet, 64, 4p.

343

344 Birkbeck, T.H., Bordevik, M., Froystad, M.K. & Baklien, A. 2007. Identification of  
345 *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *Journal of Fish Diseases*.  
346 30, 505–507.

347

348 Brasil. 2010. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010. [Online]. *Ministério da*  
349 *Pesca e Aquicultura*. Available: [http://www.mpa.gov.br/files/docs/Informacoes\\_e](http://www.mpa.gov.br/files/docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf)  
350 [Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/files/docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf). [Accessed 06  
351 April 2016].

352

353 Brasil. 2011. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011.[Online]. Ministério da  
354 Pesca e Aquicultura. Available: [http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim\\_MPA](http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim_MPA_2011pub.pdf)  
355 [2011pub.pdf](http://www.mpa.gov.br/files/docs/Boletim_MPA_2011pub.pdf). [Accessed 06 April 2016].

356

357

358

359 Brasil. 2016. Produtores querem dobrar a produção de tilápia na região. [Online]. *Jornal*  
360 *Correio de Uberlândia*. Available: [http://www.correiodeuberlandia.com.br/cidade-e-](http://www.correiodeuberlandia.com.br/cidade-e-regiao/produtores-querem-dobrar-a-producao-de-tilapia-na-regiao)  
361 [regiao/produtores-querem-dobrar-a-producao-de-tilapia-na-regiao](http://www.correiodeuberlandia.com.br/cidade-e-regiao/produtores-querem-dobrar-a-producao-de-tilapia-na-regiao). [Accessed 06 April  
362 2016].

363

364 Brito, J.L.S. & Rosa, R. 2003. Elaboração do mapa de solos da bacia do Rio Araguari na  
365 escala de 1:500.000. *II Simpósio Regional de Geografia “Perspectivas para o cerrado*  
366 *no século XXI”*. Universidade Federal de Uberlândia – Instituto de Geografia. Available:  
367 [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Mapa\\_Solos\\_Bacia\\_AraguariID-](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Mapa_Solos_Bacia_AraguariID-L6FFnePUVy.pdf)  
368 [L6FFnePUVy.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Mapa_Solos_Bacia_AraguariID-L6FFnePUVy.pdf). [Accessed 06 April 2016].

369

370 Colquhoun, D.J. & Duodu, S. 2011. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic  
371 organisms. *Veterinary Research*. 42-47.

372

373 Dean A.G., Sullivan K.M. & Soe M.M. 2013. Open Source Epidemiologic Statistics for  
374 Public Health. OpenEpi [Online]. Available from: <http://www.OpenEpi.com> [Accessed  
375 06 April 2016].

376

377 Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. 2014. The State of  
378 World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) [Online]. *World Review of fisheries and*  
379 *aquaculture*. Part I, p. 4. Available: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>. [Accessed 06  
380 April 2016].

381

382

383

384

385 FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015a. Global  
386 Aquaculture Production statistics database updated to 2013. [Online] Summary  
387 information. *Fisheries and Aquaculture Department*. Available:  
388 <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/Overviews/AquacultureStatistics2012.pdf>. [Accessed 06 April  
389 2016].

390

391 FAO -Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015b.. Cultured  
392 Aquatic Species Information Programme. [Online] *Oreochromis niloticus*. *Fisheries and*  
393 *Aquaculture Department*. Available: [http://www.fao.org/fishery/collection/cultured-](http://www.fao.org/fishery/collection/cultured-species/en)  
394 [species/en](http://www.fao.org/fishery/collection/cultured-species/en). [Accessed 06 April 2016].

395

396 Fukuda, Y., Okamura, A., Nishiyama, M., Kawakami, H., Kamaishi, T.& Yoshinga, T.  
397 2002. Granulomatosis of cultured three-line grunt *Parapristipoma trilineatum* caused by  
398 an intracellular bacterium. *Fish Pathology*, 37, 119-124.

399

400 Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and  
401 analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series: Oxford*  
402 *Journals*. 41:95-98.

403

404 Jacob, D., Wahab, T., Edvinsson, B., Peterzon, A., Boskani, T., Farhadi, L., Barduhn, A.,  
405 Grunow, R. & Sandstro, G. 2011. Identification and subtyping of *Francisella* by  
406 pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. *Letters in Applied*  
407 *Microbiology*. 53, 592–595.

408

- 409 Janda, J.M. & Abbott, S.L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification  
410 in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*.  
411 45, 2761–2764.  
412
- 413 Jeffery, K. R., Stone, D., Feist, S. W. & Verner-Jeffreys, W. 2010. An outbreak of disease  
414 caused by *Francisella* sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm  
415 in the UK. *Diseases of Aquatic Organisms*. 91,161-165.  
416
- 417 Kubitza, F. 2008. Tilápias na mira dos patógenos. *Panorama da Aquicultura*. 18, 107,  
418 28-37.  
419
- 420 Kubitza, F., Campos, J. L. & Ono, E. A. 2012. Panorama da piscicultura no Brasil:  
421 Estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade.  
422 *Panorama da Aquicultura*. 22, 132, 14-25.  
423
- 424 Leal, A.G., Tavares, G.C. & Figueiredo, H.C.P. (2014) Outbreaks and genetic diversity  
425 of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia  
426 (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. *Genetics and Molecular Research*. 13, 3, 5704-5712.  
427
- 428 Lin, Q., Li, N., Fu, X., Hu, Q., Chang, O., Liu, L., Zhang, D., Wang, G., San, G. & Wu,  
429 S. 2015. An outbreak of granulomatous inflammation associated with *Francisella*  
430 *noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in  
431 China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 33, 1-7.  
432

- 433 Martins, A.M.C.R.P.F., Catroxo, M.H.B. & Hipolito, M. 2015. *Francisella* spp.: a  
434 bactéria emergente responsável por massiva mortalidade na aquicultura. *Arquivos do*  
435 *Instituto Biológico*. 216.
- 436
- 437 Mael, M.J., Miller, D.L., Styer, E., Pouder, D.B., Yanong, R.P., Goodwin, A.E. &  
438 Schwedler, T.E. 2005. Occurrence of *Piscirickettsiosis*-like syndrome in tilapia in the  
439 continental United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 17, 601-605.
- 440
- 441 Mael, M.J., Soto, E., Morales, J.A. & Hawke, J. 2007. A *piscirickettsiosis*-like syndrome  
442 in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent.  
443 *Journal of Aquatic Animal Health*. 9, 27-34.
- 444
- 445 Mikalsen, J., Olsen, A.B., Tengs, T. & Colquhoun, D.J. 2007. *Francisella philomiragia*  
446 subsp *noatunensis* subsp nov isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L).  
447 *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 1960-1965.
- 448
- 449 Montgomery, D. C. 2013. *Introduction to statistical quality control*. 7<sup>th</sup> Edition. USA:  
450 John Wiley & Sons, Inc.
- 451
- 452 Nguyen, V.V., Dong, H.T., Senapin, S., Pirarat, N. & Rodkhum, C. 2015. *Francisella*  
453 *noatunensis* subsp. *orientalis*, an emerging bacterial pathogen affecting cultured red  
454 tilapia (*Oreochromis* sp.) in Thailand. *Aquaculture Research*. 1-6.
- 455
- 456 Noga, E. J. 2010. *Fish Disease Diagnosis and Treatment*. Second Edition, Willey-  
457 Blackwell, Carolina do Norte.

458 Nylund, A., Ottem, K.F., Watanabe, K., Karlsbakk, E. & Krossøy, B. 2006. *Francisella*  
459 sp. (Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua* L.)  
460 farming. *Archives of Microbiology*. 185, 383-392.

461

462 Oliveira, T.F., Souza, L.X., Tavares, G.C., Figueiredo, H.C.P. & Leal, C.A.G. 2014.  
463 Primeiro relato e diversidade genética de amostras de *Francisella noatunensis* subsp.  
464 *orientalis* isoladas de surtos em fazendas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no  
465 Brasil. *XIII Encontro de Patologistas de Organismos Aquáticos*. Aracajú, SE.

466

467 Olsen, A.B., Mikalsen, J., Rode, M., Alfjorden, A., Hoel, E., Straum-Lie, K., Haldorsen,  
468 R. & Colquhoun, D.J. 2006. A novel systemic granulomatous inflammatory disease in  
469 farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the  
470 genus *Francisella*. *Journal of Fish Diseases*. 29, 307-311.

471

472 Ostland, V.E., Stannard, J.A., Creek, J.J., Hedrick, R.P., Ferguson, H.W., Carlberg, J.M.  
473 & Westerman, M.E. 2006. Aquatic *Francisella*-like bacterium associated with mortality  
474 of intensively cultured hybrid striped bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. *Diseases of*  
475 *Aquatic Organisms*. 72, 135-145.

476

477 Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A., Krossøy, B. & Knappskog,  
478 D. 2007. New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria;  
479 Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua* L.).  
480 *Archives of Microbiology*. 188, 547–550.

481

482 Ottem, K.F., Nylund, T.E., Isaksen, K. & Bergh, Ø. 2008. Occurrence of *Francisella*  
483 *piscicida* in farmed and wild Atlantic cod, *Gadus morhua* L., in Norway. *Journal of Fish*  
484 *Diseases*. 31, 525-534.

485

486 Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A. & Kamaishi, T. 2009. Elevation  
487 of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella*  
488 *noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and  
489 characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important  
490 fish pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 106, 1231–1243.

491

492 R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical  
493 computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria.

494

495 Ruane, N.M., Bolton-Warberg, M., Rodger, H.D., Colquhoun, D.J., Geary, M.,  
496 McCleary, J., O'Halloran, K., Maher, K., O'Keeffe, D., Mirimin, L., Henshilwood, K.,  
497 Geoghegan, F. & Fitzgerald, R.D. 2015. An outbreak of francisellosis in wild-caught  
498 Celtic Sea Atlantic cod, *Gadus morhua* L., juveniles reared in captivity. *Journal of Fish*  
499 *Diseases*. 38, 97–102.

500

501 Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes,  
502 C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M. & Smith, M. 1977. Nucleotide sequence of  
503 bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 24, 265, 5596, 687-695.

504

- 505 Soto, E., Fernandez, D. & Hawke, J.P. 2009a. Attenuation of the fish pathogen  
506 *Francisella* sp by mutation of the *iglC\** gene. *Journal of Aquatic Animal Health*. 21, 140–  
507 149.
- 508
- 509 Soto, E., Hawke, J.P., Fernandez, D., Morales, J.A. 2009b. *Francisella* sp. an emerging  
510 pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *Journal of Fish Diseases*.  
511 32, 713–722.
- 512
- 513 Soto, E., Bowles, K., Fernandez, D. & Hawke, J.P. 2010. Development of a real-time  
514 PCR assay for identification and quantification of the fish pathogen *Francisella*  
515 *noatunensis* subsp. *orientalis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 89, 199-207.
- 516
- 517 Soto, E., Illanes, O., Hilchie, D., Morales, J.A., Sunyakumthorn, P., Hawke,  
518 J.P., Goodwin, A.E., Riggs, A. , Yanong, R.P., Poudel, D.B., Francis-Floyd,  
519 R., Arauz, M., Bogdanovic, L. & Castillo-Alcala, F. 2012. Molecular and  
520 immunohistochemical diagnosis of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from  
521 formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic*  
522 *Investigation*. 24, 5, 840-845.
- 523
- 524 Soto, E., Kidida, S., Mendeza, S., Marancikc, D., Revana, F., Hiltchiea, D. & Camus, A.  
525 2013. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* pathogenesis analyzed by experimental  
526 immersion challenge in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Veterinary Microbiology*.  
527 164, 77-84.
- 528

529 Soto, E., Brown, N., Gardenfors, Z.O., Yount, S., Revan, F., Francis, S., Kearney, M.T.  
530 & Camus, A. 2014. Effect of size and temperature at vaccination on immunization and  
531 protection conferred by a live attenuated *Francisella noatunensis* immersion vaccine in  
532 red hybrid tilapia. *Fish & Shellfish Immunology*. 41, 2, 593-599.

533

534 Soto, E., Halliday-Simmonds, I., Francis, S., Kearney, M.T. & Hansen, J.D. 2015.  
535 Biofilm formation of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Veterinary Microbiology*.  
536 181, 313-317.

537

538 Tavares, G. C. & Palhares, M. M. 2011. Epidemiologia, diagnóstico e controle das  
539 principais bacterioses que afetam a tilapicultura no Brasil. *Revista Veterinária e*  
540 *Zootecnia em Minas*. Ano XXI.

541

542 Velasco, A.J., Gómez, J.R., Agirre, X., Barrios, M., Navarro, G., Enériz, E.S.J., Cordeu,  
543 L., Gárate, L., Castillejo, J.A., Prosper, F., Torres, A. & Heiniger, A.I. 2006. PCR en  
544 tiempo real, una nueva herramienta para la toma de decisiones clínicas. *Haematologica*  
545 *edición española*. 91, 1, 27-34.

546

547

548

549

550

551

552

553

554

555 **Tables:**

556

557 **Table 1.** Primers used for the *Francisella noatunesis* subsp. *orientalis* research.

<i>Primer</i>	<i>Sequence (5' a 3')</i>	<i>Product expected size</i>
IglcF	GGGCGTATCTAAGGATGGTATGAG	88 pb
IglcR	AGCACAGCATACAGGCAAGCTA	

558

559 **Table 2.** Average  $\pm$  standard error of body mass (g) and size (cm) of *O. niloticus* males  
560 and females. Statistical analysis supplemented with Kramer-Tukey test ( $p < 0.05$ ).

<i>Analysis</i>	<i>n</i>	<i>Male</i>	<i>Female</i>	<i>Average</i>
Body mass (g)	150	1 034,76 $\pm$ 19,32 B <sup>(1)</sup>	811,90 $\pm$ 36,84 A	1 003,56 $\pm$ 18,48
Lenght (cm)	150	30,34 $\pm$ 0,20 B <sup>(2)</sup>	27,88 $\pm$ 0,43 A	29,99 $\pm$ 0,20

561 <sup>(1)</sup>  $p < 0.0001$ ; and <sup>(2)</sup>  $p < 0.0001$ .

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572 **Table 3.** Association between presence of *Francisella* spp. and analyzed gender and  
 573 length of the *O. niloticus*.

Category	qPCR Positivity	p Value
Gender		0,16
Female	9,52% (2/21)	
Male	3,10% (4/129)	
Lenght (cm)*		0,96
27,0	12,5% (1/8)	
29,0	9,52% (2/21)	
29,5	16,6% (1/6)	
30,0	12,5% (1/28)	
31,5	16,67%(1/6)	

574 \* The related data to the tilapia size listed on the table refer to the positive samples.

575

576 **Table 4.** Percentage (%) of the *Francisella* spp. presence by qPCR in male and female  
 577 *O. niloticus*.

Analisis	n	Male	Female	Average
qPCR	150	3,10 % (4/129) <sup>(1)</sup>	9,52 % (2/21)	4,00 % (6/150)

578 <sup>(1)</sup> The numerator is the positive number to *Francisella* spp. and the denominator is the  
 579 ratio total.

580

581

582

583

584 **Table 5:** Threshold cycle and melting temperature values of the positive samples and the  
 585 positive and negative controls for *Francisella* spp. conducted by qPCR.

<b>Sample</b>	<b>Threshold Cycle</b>	<b>Melting Temperature (°C)</b>
1	35,831	77,550
2	28,985	77,163
3	31,716	77,337
4	34,640	77,862
5	31,406	77,687
6	28,379	76,988
Positive Control	28,675	76,660
Negative Control	Undetermined	61,971

586

587

588 **Table 6.** Distribution and prevalence of positive samples in each slaughterhouse.

<b>Slaughterhouse</b>	<b>Positive samples</b>	<b>Prevalence (%)</b>
A	2/50	4
B	0/50	0
C	4/50	8
Total	6/150	4

589

Título do manuscrito:

***Francisella* spp. em tilápias no Brasil: uma revisão**

**Revista que receberá o manuscrito:**

**Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**

**Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity**

**ISSN: 1981-2965**

**DOI: 10.5935**

Site: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal>

**Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**

### **Normas para publicação dos trabalhos**

A Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal - Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity (ISSN 1981-2965 online e prefixo DOI 10.5935) publica artigos científicos originais nas áreas de Biotecnologia, Ciências de Alimentos, Ciências Agrárias I, Ciências Ambientais, Engenharia III, Ensino, Medicina Veterinária, Nutrição e Zootecnia / Recursos Pesqueiros.

A revista aceita artigos para publicação em português, inglês e espanhol. O envio dos trabalhos deverá ser feito por e-mail (rev.hig.san@gmail.com) ou através do cadastro que aparece no escopo do site da Revista (CADASTRO), juntamente com a carta de encaminhamento do artigo, constando o endereço completo, telefone e E-mail do autor correspondente.

### **Diretrizes para envio de novos artigos**

A partir de 01/01/2016, a Taxa de Submissão de novos artigos será de 60,00 por cada trabalho enviado para publicação, que deverá ser depositado na conta: Associação Científica dos Médicos Veterinários do Ceará - Banco do Brasil Agência 2925 - 4 Conta Corrente 14.817-2 e o comprovante Scanear ou digitar o número do depósito ou transferência e enviar para: email: rev.hig.san@gmail.com. Esse valor visa atender os custos de edição, manutenção, registros dos artigos e da revista, correções, publicações e aquisição do prefixo DOI. Em caso de rejeição do artigo, esta taxa não será devolvida. O comprovante de depósito deverá ser digitalizado e anexado no sistema como documento suplementar.

### **Apresentação dos Trabalhos**

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português ou inglês no editor de texto Word for Windows, em papel A4, com numeração de linhas por página, espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, com margens esquerda e direita de 2 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas no canto superior direito, de acordo com a categoria do trabalho. Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e Tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem ser incluídas no final do trabalho, imediatamente após as referências bibliográficas, com suas respectivas chamadas no texto.

### **Categorias dos trabalhos**

- a) **Artigos científicos:** no máximo 20 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
- b) **Comunicações científicas:** no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
- c) **Relatos de casos:** No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;

d) **Artigos de revisão:** no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

### **Digitação**

O artigo deve ter no máximo 20 páginas, impressas em papel formato A4, digitado em espaço 1,5 linhas, fonte Times New Roman, estilo normal, corpo 12. Todas as margens deverão ter 2,5 cm. Os números de páginas devem ser colocados na margem inferior, à direita.

### **Estrutura**

O artigo científico deverá ser redigido obedecendo a seguinte ordem de estrutura: título, title, autores, resumo (incluindo termos para indexação), abstract (incluindo index terms), introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos (opcional) e referências bibliográficas. Notas científicas não necessitam obedecer a estrutura do artigo, mas devem ter, obrigatoriamente, resumo (incluindo termos para indexação), title e abstract (incluindo index terms).

### **Título**

Deve ser escrito com apenas a inicial maiúscula, em negrito e centralizado na página. Como chamada de rodapé numérica, extraída do título, devem constar informações sobre a natureza do trabalho (se extraído de tese/dissertação) e referências a instituições colaboradoras. Os títulos das demais seções da estrutura deverão ser escritos com apenas a inicial maiúscula, em negrito, localizados no início da linha.

### **Autores**

Os nomes completos deverão vir abaixo do título, somente com a primeira letra maiúscula, um após outro, separados por vírgula e centralizados na linha. Como chamada de rodapé na primeira página, deve-se indicar, de cada autor, a formação acadêmica, instituição onde trabalha e endereço eletrônico.

### **Resumo e abstract**

Devem começar com estas palavras, na margem esquerda, com apenas a inicial maiúscula, em negrito, contendo no máximo 250 palavras cada e entre três e cinco termos para indexação, os quais não devem constar no título.

### **Citação de autores no texto**

São feitas pelo sobrenome, com apenas a primeira letra em maiúscula, seguido do ano de publicação. Citação com apenas um autor usar da seguinte forma: Santos (2002) ou (Santos, 2002); com dois autores, usar Pereira & Freitas (2002) ou (Pereira & Freitas, 2002); com três ou mais autores, usar Xavier et al. (1997) ou (Xavier et al., 1997).

### **Tabelas**

Serão denominadas de Tabela (em negrito), numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na parte superior. Não usar linhas verticais. As linhas horizontais devem ser usadas para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma no final da tabela. Cada dado deve ocupar uma célula distinta.

### **Figuras**

Gráficos, fotografias ou desenhos levarão a denominação geral de Figura (em negrito) sucedida de numeração arábica crescente e legenda na parte inferior. Para a preparação dos gráficos deve-se utilizar "softwares" compatíveis com "Microsoft Windows" ("Excel", "Power Point", "Harvard Graphics", etc.). Gráficos e figuras confeccionados em planilhas eletrônicas devem vir acompanhados do arquivo com a planilha original. Fotos e desenhos devem ser digitalizados; escaneados com 300 dpi, gravados em arquivo nos formatos TIF ou JPG e enviados em arquivos separados do arquivo de texto. Evitar tabelas e figuras com largura superior a 17 cm.

### **Agradecimentos**

Logo após as conclusões poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições, em estilo sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais os faz.

## **Referências Bibliográficas**

As referências, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, e reformulação número 14.724 de 2011 da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo e conter os nomes de todos os autores. Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número de participantes. A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são de inteira responsabilidade dos autores.

### **Alguns exemplos:**

#### **Livro**

MORRISON, F.B. Alimentos e Alimentação dos Animais. 2th ed. Rio de Janeiro: USAID, 1966. 892p. MORRISON, F.B. Feeds and feeding, abridged. 9th ed. Clinton:: Morrison,, 1961. 696p.

#### **Capítulo de livro**

MALAVOLTA, E.; DANTAS, J. P. Nutrição e adubação do milho. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. Melhoramento e produção do milho. 2.ed. Campinas: Fundação Cargil, 1987. cap.13, p.539 - 593.

#### **Tese/dissertação**

BORGES, H. Avaliação de volumosos e concentrados fornecidos em confinamento de bovinos de corte na micro-região de Campo Belo -MG, ESAL, Lavras - MG, 1993. 85p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal do Lavras, MG, 1993. PINHEIRO, R.R. Vírus da Artrite encefálica caprina. Desenvolvimento e padronização de ensaios imuno enzimáticos (ELISA e Dot - Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará. Belo Horizonte, 2001. 115p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2001.

### **Artigo de revista**

OLIVEIRA, E.R.; BARROS, N.N.; ROBB, T.W., JOHNSON, W.L.; PANT, K.P. Substituição das tortas de algodão por feno de leguminosas em rações baseadas em restolho da cultura do milho para ovinos em confinamento. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.21, n.5, p.555 -564, 1986.

### **Resumo de trabalho de congresso**

SOUZA, F. X.; MEDEIROS FILHO, S.; FREITAS, J. B. S. Germinação de sementes de cajazeira (*Spondias mombin* L.) com pré-embebição em água e hipoclorito de sódio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 11., 1999, Foz do Iguaçu. Resumos... Foz do Iguaçu: ABRATES, 1999. p.158.

### **Trabalho publicado em anais de congresso**

BRAYNER, A. R. A.; MEDEIROS, C. B. Incorporação do tempo em SGBD orientado a objetos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BANCO DE DADOS, 9., 1994. São Paulo. Anais... São Paulo: USP, 1994. p.16-29.

### **Trabalho de congresso pela Internet**

SILVA, R. N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., 1996, Recife. Anais eletrônicos... Recife: UFPE, 1996. Disponível em. Acesso em: 21 jan. 1997.

### **Trabalho de congresso em CD**

CANDIDO, M.J.D.; BENEVIDES, I.I.; FARIAS, S.F. et al. Comportamento de ovinos em pastagem irrigada sob lotação rotativa com três períodos de descanso. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande, Anais...Campo Grande: SBZ/EMBRAPA Gado de Corte, 2004, (CD-ROMAMB 055).

### **Citações dos autores no texto**

Deverá seguir o sistema de chamada alfabética seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

a) Os resultados de Dubey (2001) confirmaram que .....

- b) De acordo com Santos et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....
  - c) Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....
  - d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).
  - e) [...]comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).
- Citações com dois autores

Citações onde são mencionados dois autores, separar por ponto e vírgula quando estiverem citados dentro dos parênteses. Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2000). Quando os autores estiverem incluídos na sentença, utilizar o (e).

Ex: Pinheiro e Cavalcanti (2000).

Citações com mais de dois autores

Indicar o primeiro autor seguido da expressão et al. Dentro do parêntese, separar por ponto e vírgula quando houver mais de uma referência. Ex: (RUSSO et al., 2000) ou Russo et al. (2000); (RUSSO et al., 2000; FELIX et al., 2008).

Para citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados no mesmo ano, utilizar o acréscimo de letras minúsculas, ordenados alfabeticamente após a data e sem spacejamento. Ex: (SILVA, 1999a, 1999b).

As citações indiretas de diversos documentos de um mesmo autor, publicados em anos diferentes, separar as datas por vírgula. Ex: (ANDRADE, 1999, 2000, 2002). Para citações indiretas de vários documentos de diversos autores, mencionados simultaneamente, devem figurar em ordem alfabética, separados por ponto e vírgula. Ex: (BACARAT, 2008; RODRIGUES, 2003).

### **Declaração de Direito Autoral**

A revista se reserva o direito de efetuar, nos originais, alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical, com vistas a manter o padrão culto da língua e a credibilidade do veículo. Respeitará, no entanto, o estilo de escrever dos autores. Alterações, correções ou sugestões de ordem conceitual serão encaminhadas aos autores, quando necessário. As opiniões emitidas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

### **Política de Privacidade**

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

**Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal Fortaleza – CE**

**ISSN 1981-2965**

**DOI 10.5935**

**rev.hig.san@gmail.com**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

## ***Francisella* spp. em tilápias no Brasil: uma revisão**

*Francisella* spp. in tilapias in Brazil: a review

Fernanda Raghianti<sup>1\*</sup>, Marianna Vaz Rodrigues<sup>2</sup>, Marina de Mattos Ferrasso<sup>1</sup>, Otávio Augusto Martins<sup>1</sup> e Germano Francisco Biondi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* de Botucatu, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* de Botucatu, São Paulo, Brasil.

\*E-mail: raghiante@gmail.com

**Resumo:** O crescimento da tilapicultura nas últimas três décadas tem feito desse grupo de peixes um dos mais cultivados de forma extensiva no mundo. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais cultivada nos parques aquícolas brasileiros, devido a sua rusticidade, rápido crescimento, tolerância a baixa qualidade da água e considerável resistência a doenças. Porém, uma bactéria emergente em aquicultura, *Francisella noatunensis orientalis*, extremamente virulenta, tem sido responsável por mortes de tilápias nos criatórios brasileiros. O diagnóstico através de testes moleculares como a PCR em tempo real (qPCR) tem contribuído na identificação das espécies de *Francisella* envolvidas nos casos de doença granulomatosa nesses peixes. Medidas profiláticas devem ser adotadas no intuito de diminuir o risco de contaminação das pisciculturas por essa bactéria garantindo assim a saúde do plantel e dessa forma, evitando

26 prejuízos aos produtores. O presente estudo tem como objetivo informar sobre a situação  
27 da franciselose em tilápias na aquicultura brasileira.

28

29 **Palavras-chave:** Franciselose, tilapicultura, diagnóstico.

30

31 **Abstract:** The growth of tilapicultura in the last three decades has done of this fish group  
32 one of the most extensive aquaculture of the world. The Nile tilapia (*Oreochromis*  
33 *niloticus*) is the most created specie in brazilian fish farms, because of its rusticity, fast  
34 growth, low water quality tolerance and considerable diseases resistance. However, an  
35 emergente bacteria, *Francisella noatunensis* subspecies *orientalis*, extremely virulent,  
36 has been responsible for tilapia deaths in brazilian farms.

37 The molecular diagnosis like real time PCR (qPCR) has contributed to Francisella's  
38 species identification involved in granulomatous disease in these fishes. Prevention  
39 measures should be applied in order to reduce the *Francisella* contamination risk in fish  
40 farms, thus ensuring the squad health, avoiding losses to producers. This study aims to  
41 inform about the situation of francisellosis in tilapias in brazilian aquaculture.

42

43 Key-words: Francisellosis, tilapicultura, diagnosis.

44

## 45 **Introdução**

46

47 A aquicultura, uma arte milenar de origem asiática, é traduzida na atualidade  
48 como a atividade do setor primário mais promissora a atender a deficiência de nutrição  
49 da população global. Isso se deve não apenas ao fato de fornecer proteína animal de  
50 qualidade, mas também por ser uma forma de reduzir a pobreza pela geração de

51 oportunidades de trabalho para pessoas de baixa qualificação profissional nos ambientes  
52 rurais e urbanos (ROCHA; RODRIGUES, 2015).

53 Nas últimas cinco décadas, a produção global de peixes tem aumentado de forma  
54 surpreendente. A oferta alimentar tem crescido em média 3,2 % ao ano, enquanto que a  
55 população mundial cresce em torno de 1,6 %. Esse expressivo desenvolvimento da  
56 aquicultura deve-se, principalmente a combinação entre aumento da população, aumento  
57 da renda per capita e à urbanização, com melhora na eficiência dos canais de distribuição  
58 (FAO, 2014).

59 O Brasil apresenta um expressivo potencial para o desenvolvimento da  
60 aquicultura, pois comporta aproximadamente 12% da água doce disponível no planeta.  
61 São mais de cinco milhões de hectares de lâminas d'água disponíveis em reservatório de  
62 usinas hidrelétricas e bacias particulares e também uma extensa costa marítima, em torno  
63 de 8400 Km, passível de uso para produção a em cativeiro (CREPALDI *et al.*, 2006). Nos  
64 parques aquícolas continentais brasileiros os peixes mais cultivados são tilápia, tambaqui,  
65 pacu e pirapitinga (BRASIL, 2016).

66 Apesar do potencial aquícola do Brasil, o pescado ainda não ocupa papel de  
67 destaque da produção de proteína animal no país. O consumo de peixes recomendado pela  
68 Organização Mundial da Saúde é de 12 quilogramas/habitante/ano sendo que a população  
69 brasileira consome 14,5 quilogramas/habitante/ano, enquanto o consumo *per capita*  
70 mundial é de 19,2 quilogramas/habitante/ano (FAO, 2014; BRASIL, 2015).

71 A tilápia do Nilo é uma espécie tropical, originária da bacia do rio Nilo, na África.  
72 A temperatura ideal para seu crescimento varia entre 25<sup>0</sup>C e 30<sup>0</sup>C, seu desenvolvimento  
73 é prejudicado em temperaturas abaixo de 15<sup>0</sup>C e não resiste a temperaturas em torno de  
74 9<sup>0</sup>C (AYROZA, 2013). Sua carne é saborosa, com baixo teor de gordura (0,9 %) e de  
75 calorias (172 Kcal/100g de carne). Apresenta um rendimento de filé em torno de 30 % a

76 40 %, o que a torna bastante interessante para industrialização (NOGUEIRA;  
77 RODRIGUES, 2007).

78 Por esse motivo, a tilápia vem sendo considerada a espécie ideal para uso em  
79 aquicultura, devido também a sua rusticidade, rápido crescimento, tolerância a baixa  
80 qualidade da água além da considerável resistência a doenças (LITTLE *et al.*, 2008).  
81 Entretanto, assim como outras espécies de peixes, a tilápia tem sido afetada por doenças  
82 e sua vulnerabilidade a elas tem aumentado proporcionalmente à densidade desses peixes  
83 nos tanques (JEFFERY *et al.*, 2010).

84 O presente trabalho tem por objetivo apresentar a real situação da aquicultura  
85 brasileira no que diz respeito a franciselose em tilápias por meio de uma revisão de  
86 literatura.

87

## 88 **Metodologia**

89

90 A metodologia de pesquisa dessa revisão é baseada em livros e artigos científicos.

91 Os artigos científicos foram adquiridos a partir dos sites:

92 (a) [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com);

93 (b) <http://highwire.stanford.edu>;

94 (c) [www.scholar.google.com](http://www.scholar.google.com);

95 (d) [www.scielo.br](http://www.scielo.br).

96

## 97 ***Francisella* spp.**

98

99 Dentre as bacterioses encontradas nos cultivos de tilápia destaca-se a franciselose,  
100 responsável por perdas econômicas na produção de peixes. Nesse caso, *Francisella*  
101 *noatunensis* é o principal agente de risco. Essa espécie é responsável por causar

102 granulomas multifocais em órgãos internos como baço, rins e fígado, levando a hiporexia,  
103 anorexia e morte (SOTO *et al.*, 2009a; SOTO *et al.*, 2012).

104 Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Francisella* são coco-bacilos gram-  
105 negativos imóveis, parasitas intracelulares, anaeróbios facultativos, não formadores de  
106 esporos, pertencentes à família Francisellaceae. Foram isolados pela primeira vez em  
107 1910 na Califórnia nos Estados Unidos da América e posteriormente, em 1922, descritos  
108 pelo bacteriologista americano Edward Francis (RYAN; RAY, 2004).

109 A descrição do gênero *Francisella* compreende quatro espécies validadas:  
110 *Francisella tularensis*, *Francisella philomiragia*, *Francisella noatunensis* e recentemente  
111 *Francisella hispaniensis* (HUBER *et al.*, 2010). A taxonomia da espécie *Francisella*  
112 *noatunensis* está em discussão e revisão (OTTEM *et al.*, 2009). As espécies anteriormente  
113 descritas *Francisella philomiragia noatunensis* (MIKALSEN *et al.*, 2007) e *Francisella*  
114 *piscicida* (OTTEM *et al.*, 2007), sinônimos heterotípicos, são agora combinadas como  
115 *Francisella noatunensis* (OTTEM *et al.*, 2009) que compreende duas subespécies:  
116 *Francisella noatunensis noatunensis* e *Francisella noatunensis orientalis*. Ambas são  
117 responsáveis por causar doença granulomatosa em peixes de água doce e marinhos  
118 (SCHRALLHAMMER *et al.*, 2011).

119 *A Francisella noatunensis orientalis* ocorre geralmente em clima tropical onde há  
120 águas mais quentes; enquanto que a *Francisella noatunensis noatunensis* é mais frequente  
121 em clima temperado que tem águas mais frias (OTTEM ET AL., 2009; KLINGER-  
122 BOWEN ET AL., 2012).

123

## 124 **Patogenia**

125 Os mecanismos de patogenicidade da *Francisella noatunensis orientalis* não são  
126 totalmente conhecidos. Esses micro-organismos apresentam uma expressiva taxa de  
127 infectividade e notável habilidade em persistir no ambiente (SOTO *et al.*, 2015).

128 Em tilápias, a franciselose pode se manifestar de forma aguda, apresentando sinais  
129 clínicos discretos, porém com alta taxa de mortalidade; ou como uma infecção subaguda  
130 ou crônica, com sintomas inespecíficos tais como anorexia, natação errática, anemia e  
131 exoftalmia. Em alevinos essa bactéria apresenta alta infectividade e uma notável  
132 habilidade em persistir no ambiente ((SOTO *et al.*, 2015; SOTO *et al.*, 2009b).

133 As lesões mais comumente encontradas em peixes acometidos por franciselose  
134 são esplenomegalia, granulomas afetando principalmente o baço e rins, e de forma  
135 menos frequente o fígado, intestinos e músculo esquelético (Figuras 5 e 6). Nos  
136 granulomas está contida uma mistura de células epiteliais e macrófagos com um vacúolo  
137 citoplasmático contendo bactérias cocóides. As lesões musculares são geralmente  
138 granulomatosas e infiltrativas (JEFFERY *et al.*, 2010; COLQUHOUN; DUODU, 2011;  
139 CAMUS *et al.*, 2013).

140 Estudos tem contribuído para um melhor entendimento da atividade imunológica  
141 da *Francisella noatunensis* e dos fatores bacterianos envolvidos na doença. Tais  
142 pesquisas estão relacionadas com a caracterização do lipopolissacarídeo e  $\beta$ -glucano  
143 desse micro-organismo isolado de tilápias (KAY *et al.*, 2006). Há também estudos de  
144 identificação de um anticorpo específico de resposta a um constituinte não proteico de  
145 20 kilodaltons, provavelmente lipopolissacarídeo, de *Francisella noatunensis*  
146 *noatunensis* isolada de bacalhau (COLQUHOUN; DUODU, 2011).

147

## 148 **Epidemiologia**

149

150 Os primeiros relatos reconhecidos de *Francisella noatunensis orientalis* em  
151 tilápias (*Oreochromis* spp.) aconteceram em Taiwan em 1992 (CHEN *et al.*, 1994;  
152 CHERN; CHAO, 1994). Posteriormente, esse micro-organismo foi identificado em  
153 outras localidades como os Estados Unidos da América (MAUEL *et al.*, 2005), América

154 Latina (MAUEL *et al.*, 2007), mais especificamente na Costa Rica (SOTO *et al.*, 2009a),  
155 Indonésia (OTTEM *et al.*, 2009) e Inglaterra (JEFFERY *et al.*, 2010). Essa bactéria já  
156 foi relatada em outras espécies de peixes na Califórnia e no Japão, em peixes importados  
157 da China (OSTLAND *et al.*, 2006).

158 No Brasil, os surtos de doença granulomatosa em tilápias tem ocorrido desde  
159 2012. Porém, o primeiro relato confirmado de *Francisella noatunensis orientalis* no país  
160 foi descrito em 2014, em 44 tilápias (alevinos e juvenis) com sintomatologia clínica para  
161 franciselose, cultivadas em sistemas de tanques-rede, provenientes de surtos descritos  
162 em 5 regiões distintas do Estado de Minas Gerais, Brasil (LEAL *et al.*, 2014).

163 A *Francisella noatunensis orientalis* é suspeita de persistir no ambiente mesmo  
164 sem a presença de peixes (SOTO *ET AL.*, 2015). Um estudo realizado por Soto *et al.*  
165 (2015) indicou a formação de biofilmes desse micro-organismo em até 24 horas após a  
166 inoculação em ambiente controlado, com a água em diferentes temperaturas e níveis de  
167 salinidade.

168 Pelo fato da franciselose ser uma doença crônica na natureza e de alta  
169 infectividade, a prevalência de peixes infectados em uma população pode ser alta  
170 (ALFJORDEN; RUANE, 2015). Embora, um estudo de Soto *et al.* (2013a) avaliando a  
171 prevalência de *Francisella noatunensis orientalis* em 827 tilápias da ilha de Oahu, no  
172 Havaí, obtiveram apenas 8 isolados desse micro-organismo como resultado.

173

## 174 **Diagnóstico**

175

176 A identificação de bacterioses em peixes é realizada através da verificação dos  
177 sinais clínicos, isolamento de bactérias, técnicas bioquímicas e moleculares, como por  
178 exemplo, reação em cadeia da polimerase (PCR), em especial a PCR em tempo real  
179 (qPCR), seguidas de sequenciamento. Para o diagnóstico específico e definitivo são

180 utilizados métodos baseados em análises de sequenciamento da subunidade ribossomal  
181 16S RNAr (JANDA; ABBOTT, 2007). Esse fragmento do DNA genômico é conservado  
182 entre as bactérias, o que permite a identificação acurada entre as espécies de micro-  
183 organismos presentes nas amostras (CLARRIDGE, 2004).

184 As vantagens na utilização da PCR para o diagnóstico de doenças como a  
185 franciselose reside em sua capacidade de amplificar uma sequência precisa de DNA de  
186 forma rápida e precisa, com elevada sensibilidade e especificidade. Porém, há algumas  
187 limitações nessa metodologia. Para que sejam sintetizados *primers* específicos, deve-se  
188 conhecer a sequência de DNA a amplificar; e ainda, a facilidade de contaminação da  
189 amostra por DNA estranho, a limitada extensão da sequência passível de amplificação e  
190 a possibilidade de ocorrer incorporação errônea de bases durante a replicação são  
191 desvantagens a serem consideradas ao se adotar essa técnica (JORDE *et al.*, 2010).

192 A PCR é um método qualitativo e como tal, é baseado na amplificação das  
193 sequências-alvo seguidas por eletroforese em gel de agarose para detectar o DNA  
194 amplificado. Essa metodologia permite a detecção dos produtos de reação apenas ao final  
195 de todos os ciclos de termociclagem, quando a amplificação do DNA-alvo encontra-se  
196 saturada. Na PCR em tempo real (qPCR) o que ocorre é a detecção ciclo a ciclo, o que  
197 permite a verificação da expressão gênica entre as amostras no início da fase exponencial  
198 de amplificação, onde ainda não há saturação (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

199 A técnica de PCR para a detecção de *Francisella* sp. em peixes e mamíferos tem  
200 sido descrita por Jacob *et al.* (2011). Kulkarni *et al.* (2011) <sup>isolaram</sup> esse gênero em bacalhau  
201 e Birkbeck *et al.* (2007) em diferentes espécies de Salmão no Chile, utilizando essa  
202 mesma metodologia.

203 O diagnóstico de *Francisella* sp. por PCR tem sido indicado em lotes em  
204 quarentena para posterior introdução de novos peixes no plantel. Isso tem contribuído na  
205 prevenção de surtos de franciselose em tilápias (KLINGER-BOWEN, 2012).

206 Segundo Camus *et al.* (2013) para que não ocorra prejuízo na eficácia do teste de  
207 PCR para o diagnóstico de *Francisella* sp., as amostras de tecidos não devem ser enviadas  
208 fixadas em formol. Porém, em casos em que a cultura desses micro-organismos em meio  
209 específico se torna inviável, estes autores sugerem o desenvolvimento de novos  
210 protocolos de PCR no intuito de validar essa metodologia em tecidos fixados em formol.

211 Para a identificação de *Francisella noatunensis orientalis* em tilápias, a utilização  
212 de qPCR (SOTO *et al.*, 2013b) tem sido descrita. No caso desta última, sua utilização  
213 para identificação de outras espécies anteriormente descritas como sendo *Francisella*  
214 *piscicida*, já foi relatada por Ottem *et al.* (2008).

215 Ruane *et al.* (2015) investigaram um surto de doença granulomatosa em bacalhau  
216 utilizando a técnica de qPCR e identificaram bactérias do gênero *Francisella* como sendo  
217 a causa do surto.

218 Soto *et al.* (2012) confirmaram a presença de *Francisella noatunensis orientalis* e  
219 *Francisella noatunensis noatunensis*, utilizando o método de qPCR para detecção do  
220 crescimento bacteriano intracelular no *locus C* (*iglC*) em tecidos de peixes de diferentes  
221 espécies.

222 A identificação de *Francisella* spp. através da identificação da subunidade 16S  
223 RNA ribossomal tem sido estudada (JEFFERY *et al.*, 2010). Brett *et al.* (2014)  
224 investigaram um surto de bacteremia em humanos em Louisiana nos Estados Unidos. Os  
225 resultados do sequenciamento apontaram a *Francisella novicida* como agente causador  
226 da doença. Os autores realçam a importância desse método para a diferenciação do  
227 diagnóstico de doença causada por *Francisella novicida* e *Francisella tularensis* em  
228 humanos.

229 O sequenciamento da porção 16S do ribossomo tem sido utilizado como  
230 ferramenta de detecção de *Francisella noatunensis orientalis* (JEFFERY *et al.*, 2010) Lin  
231 *et al.* (2015) isolaram esse micro-organismo no sul da China, através dessa metodologia,

232 em uma investigação de doença granulomatosa em tilápias. Nguyen *et al.* (2015) também  
233 utilizaram essa metodologia para a detecção dessa bactéria em 10 peixes clinicamente  
234 doentes, oriundos de duas fazendas de cultivo de tilápias na Tailândia.

235

## 236 **Controle e prevenção**

237

238 Atualmente, não há vacinas comerciais disponíveis para a prevenção da  
239 franciselose em peixes (SOTO *et al.*, 2013b). Algumas empresas estão trabalhando no  
240 desenvolvimento de vacinas para a doença. Testes estão sendo realizados em bacalhau na  
241 Noruega, mas ainda sem resultados satisfatórios (COLQUHOUN; DUODU, 2011).

242 Segundo Kubitza (2008) o controle e a prevenção da franciselose em tilápias no  
243 Brasil são realizados na forma de aplicação de boas práticas na produção e no manejo  
244 sanitário para a prevenção de doenças. Tais práticas abrangem:

245 (a) monitoramento contínuo e manutenção de adequada qualidade da água nos  
246 tanques e, no caso de tanques-rede em reservatórios de hidrelétricas, uma análise  
247 criteriosa dos possíveis riscos associados e se possível, o histórico da qualidade dessa  
248 água;

249 (b) adequada nutrição e alimentação, com ajustes nos níveis nutricionais da ração  
250 e no tamanho dos *pellets* conforme as fases de crescimento;

251 (c) cuidados na introdução de alevinos, juvenis e reprodutores, dando preferência  
252 a aquisição de animais de produtores que aplicam boas práticas de manejo sanitário;

253 (d) manter novos estoques adquiridos separados do plantel já existente, para  
254 quarentena;

255 (e) atenção constante ao comportamento dos peixes, com remoção imediata de  
256 peixes doentes ou mortos e isolamento das unidades de produção onde esses peixes  
257 habitavam;

258 (f) exames de rotina para detectar problemas, mesmo em lotes de peixes  
259 aparentemente saudáveis;

260 (g) evitar uso indiscriminado de terapêuticos;

261 (h) realizar a desinfecção de equipamentos periodicamente.

262 Peixes acometidos por *Francisella noatunensis orientalis* tendem a não se  
263 alimentarem, por esse motivo, é indicado o uso de antibióticos como medida profilática,  
264 sendo a administração dos fármacos realizada dias antes da diminuição da temperatura da  
265 água, antecipando assim uma provável infecção (KLINGER-BOWEN, 2012).

266 A FDA (United States Food and Drugs Administration) permite o uso de três  
267 antibióticos em ração de peixes: Florfenicol, Oxitetraciclina e  
268 Sulfadimetoxina/ormetropim (FDA, 2016). No Brasil, a Instrução Normativa nº 13 de 15  
269 de julho de 2015 (BRASIL, 2015) dispõe sobre o Plano Nacional de Controle de Resíduos  
270 e Contaminantes para as cadeias de carnes e estabelece os limites máximos de resíduos  
271 de antimicrobianos que podem estar presentes na carne de peixes de cultivo. Nessa  
272 normativa, dentre os antibióticos relacionados, constam os autorizados pelo FDA com  
273 seus respectivos limites residuais permitidos na carne dos peixes e não há descrição nesta  
274 legislação de proibição do uso dos mesmos.

275 Os imunoestimulantes são substâncias químicas, sintéticas ou biológicas que  
276 atuam no sistema imune específico, aumentando a atividade fagocítica e bactericida das  
277 células de defesa, melhorando a resistência do peixe a doenças infecciosas. Seu uso pode  
278 ser uma interessante alternativa a ser aplicada nas boas práticas de manejo no intuito de  
279 reduzir ou não utilizar antimicrobianos no ciclo de produção de tilápias (BRICKNELL;  
280 DALMO, 2005).

281 A eficácia dessas práticas está diretamente relacionada à qualidade sanitária dos  
282 peixes comercializados. A conscientização dos produtores em relação aos riscos e da

283 importância desse manejo preventivo são de suma importância na garantia da saúde da  
284 população.

285

## 286 **Considerações finais**

287

288 Mais estudos devem ser realizados no intuito de melhorar o conhecimento a  
289 respeito da importância da *Francisella* sp. em criatórios de tilápias no Brasil, a  
290 compreensão de sua patogenia e o aprimoramento das técnicas moleculares de  
291 diagnóstico para que as autoridades possam tomar as medidas cabíveis para o controle e  
292 prevenção da franciselose. O desenvolvimento de antibióticos para o tratamento das  
293 tilápias requer estudos científicos e práticos sendo que a aplicação dos mesmos exige  
294 consciência e cuidados, para que não haja desenvolvimento de resistência por parte dos  
295 micro-organismos envolvidos e também, a contaminação do meio ambiente. O uso de  
296 imunostimulantes pode ser uma alternativa viável no intuito de se evitar os danos  
297 causados pelo uso de antimicrobianos.

298

299

300

## 301 **Referências**

302

303 ALFJORDEN, A.; RUANE, N. Francisellosis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.).  
304 **International Council for the Exploration of the Sea (ICES)** - Identification leaflets  
305 for diseases and parasites of fish and shellfish, Leaflet No. 64, 4p. 2015.

306

307 AYROZA, L.M.S. Criação de Tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede,  
308 na Usina Hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR. 2013. 104 f. Tese

309 (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista,  
310 Jaboticabal, SP. 2009.

311

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

315

316 BRASIL. SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. Consumo de pescado no  
317 Brasil está abaixo do recomendado pela OMS. Publicado em 01 de set. 2015. Disponível  
318 em: [http://sna.agr.br/consumo-de-pescado-no-brasil-esta-baixo-do-recomendado-pela-](http://sna.agr.br/consumo-de-pescado-no-brasil-esta-baixo-do-recomendado-pela-oms/)  
319 [oms/](http://sna.agr.br/consumo-de-pescado-no-brasil-esta-baixo-do-recomendado-pela-oms/). Acesso em: 06 de jan. 2016.

320

321 BRASIL. CORREIO DE UBERLÂNDIA. Produtores querem dobrar a produção de  
322 tilápia na região. Publicado em 02 de jan. 2016. Disponível em:  
323 [http://www.correiodeuberlandia.com.br/cidade-e-regiao/produtores-querem-dobrar-a-](http://www.correiodeuberlandia.com.br/cidade-e-regiao/produtores-querem-dobrar-a-producao-de-tilapia-na-regiao/)  
324 [producao-de-tilapia-na-regiao/](http://www.correiodeuberlandia.com.br/cidade-e-regiao/produtores-querem-dobrar-a-producao-de-tilapia-na-regiao/). Acesso em: 02 de jan.2016.

325

326 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução  
327 Normativa nº 13 de 15 de julho de 2015. Publica o Subprograma de Monitoramento e  
328 Subprograma Exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes  
329 – PNCRC de 2015 para as cadeias de carnes bovina, suína, caprina, ovina, equine, Coelho,  
330 aves, avestruz, de leite, pescado, mel e ovos. **Diário Oficial da República Federativa**  
331 **do Brasil**. Brasília, DF, 20 jul. 2015. Seção 1, nº136, p. 5-12.

332

333 BRETT, M.E.; RESPICIO-KINGRY, L.B.; YENDELL, S.; RATARD, R.; HAND, J.;  
334 BALSAMO, G.; SCOTT-WALDRON, C.; O'NEAL, C.; KIDWELL, D.; YOCKEY, R.;

- 335 SINGH, P.; CARPENTER, J.; HILL, V.; PETERSEN, K.M.; MEAD, P. Outbreak of  
336 *Francisella novicida* Bacteremia Among Inmates at a Louisiana Correctional Facility.  
337 **Clinical Infectious Diseases**, v.59, n.6, p.826–833. 2014.
- 338
- 339 BRICKNELL, J.R.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval  
340 aquaculture. **Fish Shellfish Immunology**, v.19, p. 457-472. 2005.
- 341
- 342 CAMUS, A.C.; DILL, J.A.; MCDERMOTT, A.J.; CLAUSS, T.M.; BERLINER, A.L.;  
343 BOYLAN, S.M.; SOTO, E. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infection in Indo-  
344 Pacific reef fish entering the United States through the ornamental fish trade. **Journal of**  
345 **Fish Diseases**, v. 36, n. 681–684. 2013.
- 346
- 347 CHEN, S.C.; TUNG, M.C.; CHEN, S.P.; TSAI, J.F; WANG, R.S.; CHEN, S.C.;  
348 ADAMS, A. Systematic granulomas caused by a rickettsia-like organism in Nile tilapia,  
349 *Oreochromis niloticus* (L.), from southern Taiwan. **Journal of Fish Diseases**, v. 17, p.  
350 591-599.1994.
- 351
- 352 CHERN, R.S; CHAO, C.B. Outbreaks of a disease caused by rickettsia-like organism in  
353 cultured tilapias in Taiwan. **Fish Pathology**, v.29, p. 61-71.1994.
- 354
- 355 CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of  
356 bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology**  
357 **Reviews**, v.17, p. 840-862. 2004.
- 358
- 359 CREPALDI, D.V.; FARIA, P.M.C.; TEIXEIRA, E.A.; RIBEIRO, L.P.; COSTA, A.P.C.;  
360 MELO, D.C.; CINTRA, A.P.R.; PRADO, S.A.; COSTA, F.A.A.; DRUMOND, M.L.;

- 361 LOPES, V.E.; MORAES, V.E. A situação da aquacultura e da pesca no Brasil e no  
362 mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.3/4, p.81-85.2006.  
363
- 364 COLQUHOUN, D.J.; DUODU, S. Francisella infections in farmed and wild aquatic  
365 organisms. **Veterinary Research**, p. 42-47. 2011.  
366
- 367 FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World  
368 Fisheries and Aquaculture (SOFIA). **World Review of fisheries and aquaculture, Part**  
369 **I**, p. 4. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>. Acesso em: 06 de jan.  
370 2016.  
371
- 372 FDA. UNITED STATES FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. Aquaculture>  
373 approved drugs. Disponível em:  
374 [http://www.fda.gov/Animalveterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/ucm1](http://www.fda.gov/Animalveterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/ucm132954.htm)  
375 [32954.htm](http://www.fda.gov/Animalveterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/ucm132954.htm). Acesso em: 12 de fev. 2016.  
376
- 377 HUBER, B.; ESCUDERO, R.; BUSSE, H.J.; SEIBOLD, E.; SCHOLZ, H.C.; ANDA, P.;  
378 KAMPFER, P.; SPLETTSTOESSER, W.D. Description of *Francisella hispaniensis* sp.  
379 nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al.  
380 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. Nov. and  
381 emended description of the genus *Francisella*. **International Journal of Systematic and**  
382 **Evolutionary Microbiology**, v.60, p. 1887-1896. 2010.  
383
- 384 JACOB, D.; WAHAB, T.; EDVINSSON, B.; PETERZON, A.; BOSKANI, T.;  
385 FARHADI, L.; BARDUHN, A.; GRUNOW, R.; SANDSTRO, G. Identification and

386 subtyping of *Francisella* by pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA  
387 fragments. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p.592–595. 2011.

388

389 JANDA, J.M., ABBOTT, S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in  
390 the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**,  
391 v. 45, p. 2761–2764. 2007.

392

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

396

397 JORDE, L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M.J. **Medical Genetics**. 5<sup>th</sup> Edition. Elsevier.  
398 2010.

399

400 KAY, W.; PETERSEN, B.O.; DUUS, J.O.; PERRY,, M.B.; VINOGRADOV, E.  
401 Characterization of the lipopolysaccharide and beta-glucan of the fish pathogen  
402 *Francisella victoria*. **Federation of European Biochemical Society Journal**, v. 273,  
403 p.m3002 – 3013. 2006.

404

405 KLINGER-BOWEN, R.E.C.; TAMARU, C.S.; McGOVERN-HOPKINS, K.; FOX, B.K.  
406 Francisellosis in Tilapia. **Center for Tropical and Subtropical Aquaculture (CTSA)**  
407 Publication #158, 5pp. 2012. Disponível em:  
408 [http://www.ctsa.org/index.php/publications/ctsa\\_publications1](http://www.ctsa.org/index.php/publications/ctsa_publications1). Acesso em: 20 de jan.  
409 2016.

410

- 411 KUBITZA, F. Tilápias na mira dos patógenos. **Panorama da Aquicultura**, v.18, n.107,  
412 p.28-37.2008.
- 413
- 414 KULKARNI, A.; MARLOWE, A.; CAIPANG, A.; KORSNES, K.; BRINCHMANN,  
415 M.F.; KIRON, V. Molecular diagnosis of francisellosis, a systemic granulomatous  
416 inflammatory disease in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Veterinary Research**  
417 **Communications**, v.35, p.67–77. 2011.
- 418
- 419 LEAL, A.G.;TAVARES, G.C.; FIGUEIREDO, H.C.P. Outbreaks and genetic diversity  
420 of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia  
421 (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.13, n.3, p.5704-  
422 5712. 2014.
- 423
- 424 LIN, Q.; LI, N.; FU, X.; HU, Q.; CHANG, O.; LIU, L.; ZHANG, D.; WANG, G.; SAN,  
425 G.; WU, S. An outbreak of granulomatous inflammation associated with *Francisella*  
426 *noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in  
427 China. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v.33, p.1-7. 2015.
- 428
- 429 LITTLE, D.C.; MURRAY, F.J.; LESCHEN, W.; BOYD, K.; WATTERSON, A.;  
430 YOUNG, A. Options for producing a warm water fish in the UK: limits to 'Green  
431 Growth'? **Trends in Food Science &Technology**, v.19, p. 255-264. 2008.
- 432
- 433 MAUEL, M.J.; MILLER, D.L.; STYER, E.; POWDER, D.B.; YANONG, R.P.;  
434 GOODWIN, A.E.; SCHWEDLER, T.E. Occurrence of Piscirickettsiosis-like syndrome  
435 in tilapia in the continental United States. **Journal of Veterinary Diagnostic**  
436 **Investigation**, v.17, p. 601-605. 2005.

- 437 MAUEL, M.J.; SOTO, E.; MORALIS, J.A.; HAWKE, J. A piscirickettsiosis-like  
438 syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the  
439 pathogenic agent. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 9, p.27-34. 2007.
- 440
- 441 NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia de PCR e RT-PCR  
442 em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67,  
443 p. 7-19. 2010.
- 444
- 445 NGUYEN, V.V.; DONG, H.T.; SENAPIN, S.; PIRARAT, N.; RODKHUM, C.  
446 *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, an emerging bacterial pathogen affecting  
447 cultured red tilapia (*Oreochromis* sp.) in Thailand. **Aquaculture Research**, p. 1-6. 2015.
- 448
- 449 NOGUEIRA, A.; RODRIGUES, T. Criação de tilápias em tanques-rede. **SEBRAE**,  
450 Salvador, Bahia. 23p. 2007.
- 451
- 452 OSTLAND, V.E.; STANNARD, J.A.; CREEK, J.J.; HEDRICK, R.P.; FERGUSON,  
453 H.W.; CARLBERG, J.M.; WESTERMAN, M.E. Aquatic *Francisella*-like bacterium  
454 associated with mortality of intensively cultured hybrid striped bass *Morone chrysops* x  
455 *M. saxatilis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.72, p.135-145. 2006.
- 456
- 457 OTTEM, K.F.; NYLUND, T.E.; ISAKSEN, K.; BERGH, Ø. Occurrence of *Francisella*  
458 *piscicida* in farmed and wild Atlantic cod, *Gadus morhua* L., in Norway. **Journal of Fish**  
459 **Diseases**, v.31, p. 525-534. 2008.
- 460
- 461 OTTEM, K.F.; NYLUND, A.; KARLSBAKK, E.; FRIIS-MØLLER, A.; KAMAISHI, T.  
462 Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to

- 463 *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn.  
464 nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two  
465 important fish pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p.1231–1243. 2009.  
466
- 467 RYAN, K.J.; RAY, C.G. **Sherris Medical Microbiology**. 4th ed. McGraw Hill. 2004.  
468 pp. 488–90.  
469
- 470 ROCHA, I.; RODRIGUES, J. A aquicultura e a oferta mundial de proteína de origem  
471 animal. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Postado em 5 de mar. 2015.  
472 Disponível em: [http://abccam.com.br/site/a-aquicultura-e-a-oferta-mundial-de-proteinas-](http://abccam.com.br/site/a-aquicultura-e-a-oferta-mundial-de-proteinas-de-origem-animal/)  
473 [de-origem-animal/](http://abccam.com.br/site/a-aquicultura-e-a-oferta-mundial-de-proteinas-de-origem-animal/). Acesso em: 05 jan. 2016.  
474
- 475 RUANE, N.M.; BOLTON-WARBERG, M.; RODGER, H.D.; COLQUHOUN, D.J.;  
476 GEARY, M.; McCLEARY, J.; O'HALLORAN, K.; MAHER, K.; O'KEEFFE, D.;  
477 MIRIMIN, L.; HENSHILWOOD, K.; GEOGHEGAN, F.; FITZGERALD, R.D. An  
478 outbreak of francisellosis in wild-caught Celtic Sea Atlantic cod, *Gadus morhua* L.,  
479 juveniles reared in captivity. **Journal of Fish Diseases**, v.38, p. 97–102. 2015.  
480
- 481 SCHRALLHAMMER, M.; SCHWEIKERT, M.; VALLESI, A.; VERNI, F.; PETRONI,  
482 G. Detection of a Novel Subspecies of *Francisella noatunensis* as Endosymbiont of the  
483 Ciliate *Euplotes raikovi*. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 455-464. 2011.  
484
- 485 SOTO, E.; HAWKE, J.P.; FERNANDEZ, D.; MORALES, J.A. *Francisella* sp. an  
486 emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. **Journal of Fish**  
487 **Diseases**, v.32, p. 713–722. 2009a.  
488

- 489 SOTO, E.; FERNANDEZ, D.; HAWKE, J.P. Attenuation of the fish pathogen *Francisella*  
490 sp by mutation of the *iglC\** gene. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 21, p. 140–149.  
491 2009b.  
492
- 493 SOTO, E.; ILLANES, O.; HILCHIE, D.; MORALES, J.A.; SUNYAKUMTHORN,  
494 P.; HAWKE, J.P.; GOODWIN, A.E.; RIGGS, A. ; YANONG, R.P.; POUDEK,  
495 D,B.; FRANCIS-FLOYD, R.; ARAUZ, M.; BOGDANOVIC, L.; CASTILLO-  
496 ALCALA, F. Molecular and immunohistochemical diagnosis of *Francisella noatunensis*  
497 subsp. *orientalis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary**  
498 **Diagnostic Investigation**, v. 24, n.5, p. 840-845. 2012.  
499
- 500 SOTO, E.; McGOVERN-HOPKINS, K.; KLINGER-BOWEN, R.; FOX, B.K.; BROCK,  
501 J.; ANTONIO, N.; WAAL, Z.; RUSHTON, S.; MILL, A.; TAMARU, C.S. Prevalence  
502 of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in cultured tilapia on the island of Oahu,  
503 Hawaii. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.25, n.2, p. 104-109. 2013a.  
504
- 505 SOTO, E.; KIDDA, S.; MENDEZA, S.; MARANCIK, D.; REVANA, F.; HILCHIEA,  
506 D.; CAMUS, A. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* pathogenesis analyzed by  
507 experimental immersion challenge in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Veterinary**  
508 **Microbiology**, v. 164, p. 77-84. 2013b.  
509
- 510 SOTO, E.; HALLIDAY-SIMMONDS, I.; FRANCIS, S.; KEARNEY, M.T.; HANSEN,  
511 J.D. Biofilm formation of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. **Veterinary**  
512 **Microbiology**, v.181, p.313-317. 2015.

Título do manuscrito:

**Hepatomegalia e esplenomegalia em *Oreochromis niloticus* cultivadas em sistema de tanque-rede**

Revista que receberá o manuscrito:

**Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**

**Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity**

**ISSN: 1981-2965**

**DOI: 10.5935**

Site: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal>



26 hepatomegalia e a esplenomegalia podem causar distúrbios metabólicos e,  
27 consequentemente, prejuízos na produção de *Oreochromis niloticus*.

28 **Palavras-chave:** Esplenomegalia, Hepatomegalia, *Oreochromis niloticus*.

29

30 **Abstract:** The hepatomegaly and splenomegaly are changes in mass and/or size of the  
31 liver and spleen, respectively. This study aims to assess the presence of hepatomegaly  
32 and splenomegaly in *Oreochromis niloticus* cultivated in cages system. Were collected  
33 150 animals of three different refrigerators (A, B and C) who received the fish of cages  
34 system. After necropsy, the quantities of hepatomegaly and splenomegaly were  
35 measured. The main results show that 24.66 % of the fish showed morphological changes  
36 in the liver and spleen. We conclude that hepatomegaly and splenomegaly can cause  
37 metabolic disorders and therefore, losses in the production of *Oreochromis niloticus*.

38 **Keywords:** Hepatomegaly, Splenomegaly, *Oreochromis niloticus*.

39

## 40 **Introdução**

41

42 A hepatomegalia é uma condição na qual o tamanho do fígado está anormal e pode  
43 indicar a existência de uma hepatopatia. Normalmente a hepatomegalia é assintomática.  
44 As possíveis causas gerais incluem as infecções (virais e bacterianas), parasitas,  
45 neoplasias, anemias, estados tóxicos, doenças de armazenamento, insuficiência cardíaca  
46 e distúrbios metabólicos (AL-GHAIS, 2013; O'HARE *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2016). A  
47 esplenomegalia consiste no aumento do volume do baço. Quando o baço aumenta de  
48 tamanho, a sua capacidade de reter e armazenar células sanguíneas aumenta. A  
49 esplenomegalia pode reduzir o número de eritrócitos, de leucócitos e de plaquetas  
50 circulantes (SOTO *et al.*, 2011; DARGART *et al.*, 2012; SOMJA *et al.*, 2014).

51 Tavares-Dias *et al.* (2000a) relataram que o fígado dos peixes é o principal sítio de  
52 armazenamento de glicogênio e certa quantidade de gordura também pode ser estocada  
53 nesse órgão. Variações na quantidade de gordura e/ou glicogênio estocados no fígado  
54 influenciam significativamente no peso ou no tamanho desse órgão. Variações no peso  
55 do baço e do fígado de peixes indicam distúrbios que podem ocorrer durante os processos  
56 patológicos (TAVARES-DIAS *et al.*, 2000b).

57 Os peixes, por serem desprovidos de linfonodos e de cavidade medular nos ossos,  
58 têm o tecido hematopoiético localizado no estroma esplênico e no interstício renal. O  
59 baço dos peixes tem a função de filtrar o sangue. Além disso, é um importante órgão eritro  
60 e leucopoiético (TAVARES-DIAS *et al.*, 2000b).

61 A espécie *O. niloticus* apresenta um bom desempenho em sistemas intensivos de  
62 produção e vem se adaptando com sucesso a cultivos em tanques-rede (AYROZA, 2009).  
63 Esse sistema de criação de peixes tem sido uma ótima alternativa para aproveitamento  
64 dos ambientes aquáticos inexplorados, dispensando o desmatamento e evitando  
65 problemas com erosão e assoreamento (COLT, 1991; CARNEIRO *et al.*, 1999;  
66 COELHO; CYRINO, 2006).

67 Um dos grandes entraves da aquicultura é a densidade populacional em relação à  
68 área de criação, pois propiciam maiores concentrações de matéria orgânica,  
69 desenvolvimento de algas e outros micro-organismos que causam impacto ambiental e  
70 nos animais. A criação em tanques-rede favorece a alta densidade, gerando estresse nos  
71 peixes, tornando-os aptos ao desenvolvimento de diversas infecções (SOTO *et al.*, 2009;  
72 SOTO *et al.*, 2012).

73 Com base nessas informações, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a  
74 presença de hepatomegalia e de esplenomegalia em *Oreochromis niloticus* cultivadas em  
75 sistema de tanques-rede.

76

## 77 **Material e métodos**

### 78 *Amostras*

79 A coleta de *Oreochromis niloticus* foi realizada na bacia hidrográfica do Rio  
80 Araguari que se localiza na mesorregião do Triângulo Mineiro, na porção oeste do Estado  
81 de Minas Gerais, Brasil, entre as coordenadas geográficas de 19°35'21.67'' de latitude  
82 Sul e 44° 39'16.44'' de longitude Oeste de Greenwich, o qual ocupa uma área de 20.186  
83 Km<sup>2</sup>, abrangendo parte de 20 municípios.

84 Foram coletados 150 animais de três frigoríficos distintos (A, B e C) que recebem  
85 peixes de diferentes pisciculturas, da região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil,  
86 fiscalizados pelo Instituto Mineiro de Agropecuária. Foram coletados cinquenta animais  
87 de cada frigorífico. Cada estabelecimento recebe *Oreochromis niloticus* provenientes de  
88 criatórios distintos localizados em reservatório de uma usina hidrelétrica distinta,  
89 totalizando três usinas sendo todas abastecidas pelo Rio Araguari, e que utilizam o  
90 sistema de tanques-rede.

91 Após a insensibilização dos animais em gelo pelo método aprovado pela legislação  
92 sanitária brasileira para garantir o bem-estar de peixes a serem abatidos, os animais  
93 machos e fêmeas foram selecionadas aleatoriamente. Foram mensurados a massa  
94 corpórea (g) e o comprimento (cm) dos animais. Em seguida, as tilápias foram submetidas  
95 a necropsia conforme descrito por Noga (2010).

96 O presente estudo seguiu os princípios éticos em pesquisa animal e foi aprovado  
97 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina  
98 Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *Campus* de  
99 Botucatu, São Paulo, Brasil, conforme atestado referente ao protocolo n° 09/2016.

100

101

102

### 103 *Presença de hepatomegalia e esplenomegalia*

104 As alterações morfológicas do fígado e do baço foram avaliadas na necropsia.  
105 Foram mensuradas as quantidades de hepatomegalia e esplenomegalia presentes em  
106 *Oreochromis niloticus*.

107

### 108 *Análise estatística*

109 Para calcular o tamanho da amostra ( $n$ ) foi utilizada a seguinte fórmula:  $n =$   
110  $N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1-p) / (N-1) \cdot e^2 + Z^2 \cdot p \cdot (1-p)$ . Onde:  $N$  é o tamanho do universo,  $Z$  é o desvio do  
111 valor médio que aceitamos para alcançar o nível de confiança desejado (nível de  
112 confiança 95 %,  $Z=1,96$ ),  $e$  é a margem de erro máximo que eu quero admitir (por  
113 exemplo, 5 %), e  $p$  é a proporção que esperamos encontrar.

114 O estudo estatístico foi realizado através da análise de variância Anova e  
115 complementado com o teste de comparações múltiplas de Kramer-Tukey. Os resultados  
116 foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. As conclusões estatísticas foram  
117 realizadas com 5 % de significância (MONTGOMERY, 2013).

118

### 119 **Resultados e discussão**

120

121 A hepatomegalia de *Oreochromis niloticus* esteve presente nos frigoríficos. A  
122 hepatomegalia foi de 18 % (9/50), 10 % (5/50) e 36 % (36/50) nos frigoríficos A, B e C,  
123 respectivamente (figura 1). O frigorífico C foi o estabelecimento que apresentou o índice  
124 percentual maior para hepatomegalia comparado com os demais estabelecimentos.  
125 Considerando todos os frigoríficos, a presença de hepatomegalia foi de 21,33 % (32/150)  
126 em todos os peixes.

127 A esplenomegalia de *Oreochromis niloticus* esteve presente em apenas dois  
128 frigoríficos. A esplenomegalia foi de 4 % e 6 % nos frigoríficos A e C, respectivamente

129 (figura 2). O frigorífico C apresentou um índice percentual maior para a esplenomegalia.  
130 A presença de esplenomegalia foi de 3,33 % (5/150) nos animais de todos os frigoríficos.

131 Na figura 3 mostra que 24,66 % de *Oreochromis niloticus* coletados em sistema de  
132 tanque-rede apresentaram alterações morfológicas e 75,34 % não apresentaram nenhuma  
133 alteração morfológica do fígado e do baço.

134 A presença e a ausência de hepatomegalia não apresentaram diferenças  
135 significativas na massa ( $p=0,7403$ ) e no comprimento ( $p=0,3907$ ) de *Oreochromis*  
136 *niloticus* coletados em sistema de tanque-rede. No que diz respeito à esplenomegalia, a  
137 presença e a ausência também não apresentaram diferenças significativas na massa  
138 ( $p=0,4442$ ) e no comprimento ( $p=0,1526$ ) de *Oreochromis niloticus* (tabela 1).

139 Tavares-Dias *et al.* (2000b) encontraram dados de massa corpórea dos peixes bem  
140 inferiores que os encontrados em nosso experimento. No que diz respeito ao comprimento  
141 dos animais, os nossos dados foram semelhantes com os dados de Tavares-Dias *et al.*  
142 (2000a,b).

143 Quentel & Obach (1992) obtiveram valores significativos para a relação  
144 hepatossomática e esplenossomática demonstrando que essas alterações estão relacionadas  
145 com os distúrbios hepáticos e esplênicos, que podem ocorrer durante os processos  
146 patológicos. O presente experimento apresentou um valor consideravelmente alto de  
147 hepatomegalia e de esplenomegalia (24,66 %) para uma produção em sistema de tanques-  
148 rede retratando que muitos animais têm distúrbios metabólicos. Acreditamos que esses  
149 distúrbios metabólicos do fígado e do baço podem trazer prejuízos econômicos na  
150 produção de *Oreochromis niloticus*.

151 Tavares-Dias *et al.* (2000b) relataram que os níveis elevados de carboidratos na  
152 dieta, aumenta o glicogênio hepático e o peso do fígado. Rafael & Braunbeck (1988)  
153 observaram maior ganho de peso corporal e de massa hepática nos peixes mantidos com  
154 ração artificial, quando comparado com peixes mantidos com alimentação natural.

155 Tavares-Dias *et al.* (2000a,b) ressaltaram que o estudo da alteração morfológica do fígado  
156 pode ser empregado para acompanhar o grau de atividade alimentar de uma dada espécie  
157 aquática.

158 Segundo Quentel & Obach (1992) e Tavares-Dias *et al.* (2000b) relataram que o  
159 baço é um importante órgão eritro e leucopoético. Esplenomegalia sugere o  
160 desenvolvimento de respostas leucocitárias às infecções ou à produção de eritrócitos para  
161 reposição sanguínea em casos de processos anemiantes. O aumento do volume do baço  
162 ocorre devido a alterações bioquímicas e fisiológicas necessárias para manter a  
163 homeostasia orgânica como resposta a infecções ou outro tipo de agressão ambiental  
164 (LOWE-JINDE, 1980; QUENTEL & OBACH, 1992; TAVARES-DIAS *et al.*, 2000a,b).

165

## 166 **Conclusão**

167 Podemos concluir que:

- 168 • As presenças de hepatomegalia e esplenomegalia são alterações  
169 morfológicas que podem indicar distúrbios metabólicos em *Oreochromis*  
170 *niloticus*.
- 171 • O alto índice percentual de hepatomegalia e esplenomegalia deve afetar a  
172 produção de *Oreochromis niloticus* onde poderão ser demonstradas por  
173 pesquisas futuras.

174

## 175 **Referências**

176 AL-GHAIS, S. M. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as  
177 potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. **Marine Pollution**  
178 **Bulletin**, 74(1):183-6. Doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.07.005. 2013.

- 179 AYROZA, L.M.S. **Criação de Tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-**  
180 **rede, na Usina Hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR.** 2013. 104 f.  
181 Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual  
182 Paulista, Jaboticabal, SP. 2009.
- 183
- 184 CARNEIRO, P. C. F.; MARTINS, M. I. E. G.; CYRINO, J. E. P. Estudo de caso da  
185 criação comercial da tilápia vermelha em tanques-rede – avaliação econômica.  
186 **Informações Econômicas**, 29 (8): 52-61, 1999.
- 187
- 188 COELHO, S. R. C.; CYRINO, J. E. P. Custos na produção intensiva de surubins em  
189 gaiolas. **Informações Econômicas**, 36 (4): 7-14, 2006.
- 190
- 191 COLT, J. Aquacultural production systems. **Journal of Animal Science**, 69 (10):4183-  
192 4192. doi:/1991.69104183x. 1991.
- 193
- 194 DARGART, J. L.; FISH, K.; GORDON, L. I.; LONGNECKER, R.; CEN, O. Dasatinib  
195 therapy results in decreased B cell proliferation, splenomegaly, and tumor growth in a  
196 murine model of lymphoma expressing Myc and Epstein-Barr virus LMP2A. **Antiviral**  
197 **Research**, 95(1):49-56. Doi: 10.1016/j.antiviral.2012.05.003. 2012.
- 198
- 199 HU, R. W.; QUINN, K. P.; TABIBIAN, J. H. Intrapelvic liver: massive hepatomegaly  
200 secondary to metastatic malignancy. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, Apr  
201 13. pii: S1542-3565(16)30063-5. Doi: 10.1016/j.cgh.2016.04.003. 2016.
- 202
- 203 LOWE-JINDE, L. Observations of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, infected  
204 with *Crypbobias salmoslica*. **Jour. Fish Biol.**, 17 (1): 23-30, 1980.

- 205 MONTGOMERY, D. C. **Introduction to statistical quality control**. 7<sup>th</sup> Edition. USA:  
206 John Wiley & Sons, Inc. 2013.  
207
- 208 NOGA, E. J. **Fish Disease: Diagnosis and Treatment**. USA, Wiley-Blackwell. 2010.  
209
- 210 O'HARE, E. A.; WANG, X.; MONTASSER, M. E.; CHANG, Y. P.; MITCHELL, B. D.;  
211 ZAGHLOUL, N. A. Disruption of *ldlr* causes increased LDL-c and vascular lipid  
212 accumulation in a zebrafish model of hypercholesterolemia. **Journal of Lipid Research**,  
213 55(11):2242-53. Doi: 10.1194/jlr.M046540. 2014.  
214
- 215 QUENTEL C.; OBACH, A. The cellular composition of the blood and haematopoietic  
216 organs of turbot *Scophthalmus maximus* L.. **Jour. Fish Biol.**, 41: 709-716. 1992.  
217
- 218 RAFAEL, J.; BRAUNBECK, T. Interacting effects of diet and environmental  
219 temperature on biochemical parameters in the liver of *Leuciscus idus melanolus*  
220 (Cyprinidae: Teleostei). **Fish Physiol. Biochem.**, 5 (I): 9-19, 1988.  
221
- 222 SOMJA, J.; BISIG, B.; BONNET, C.; HERENS, C.; SIEBERT, R., DE LEVAL, L.  
223 Peripheral T-cell lymphoma with t(6;14)(p25;q11.2) translocation presenting with  
224 massive splenomegaly. **Virchows Archiv: an international journal of pathology**,  
225 464(6):735-41. Doi: 10.1007/s00428-014-1560-3. 2014.  
226
- 227 SOTO, E.; HAWKE, J.P.; FERNANDEZ, D.; MORALES, J.A. *Francisella* sp. an  
228 emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. **Journal of Fish**  
229 **Diseases**, v.32, p. 713–722. 2009.  
230

231 SOTO, E.; ILLANES, O.; HILCHIE, D.; MORALES, J.A.; SUNYAKUMTHORN, P.;  
232 HAWKE, J.P.; GOODWIN, A.E.; RIGGS, A.; YANONG, R.P.; POWDER, D.B.;  
233 FRANCIS-FLOYD, R.; ARAUZ, M.; BOGDANOVIC, L.; CASTILLO-ALCALA, F.  
234 Molecular and immunohistochemical diagnosis of *Francisella noatunensis* subsp.  
235 *orientalis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary**  
236 **Diagnostic Investigation**, v. 24, n.5, p. 840-845. 2012.

237

238 SOTO, E.; BAUMGARTNER, W.; WILES, J.; HAWKE, J. P. *Francisella asiatica* as the  
239 causative agent of piscine francisellosis in cultured tilapia (*Oreochromis* sp.) in the United  
240 States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the**  
241 **American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.** 23(4):821-5.  
242 Doi: 10.1177/1040638711407058. 2011.

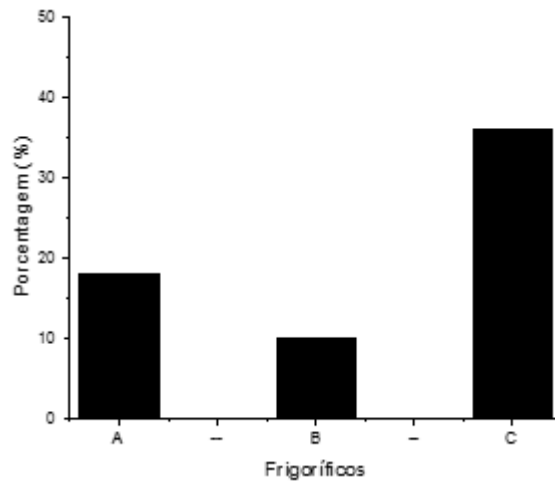
243

244 TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; KRONKA, N. Fator de  
245 condição e relação hepato e esplenossomática em teleósteos de água doce naturalmente  
246 parasitados. **Acta Scientiarum**, 22(2):533-537, 2000 a.

247

248 TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Relação hepatossomática e  
249 esplenossomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de**  
250 **Zoologia**, 17(1): 273 - 281, 2000 b.

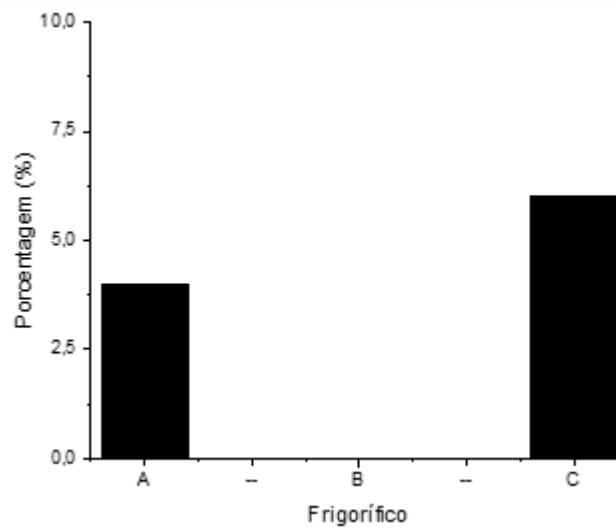
251



252

253 **Figura 1.** Porcentagem (%) de hepatomegalia encontrados em *Oreochromis niloticus*  
254 cultivadas em sistema tanque-rede provenientes de diferentes frigoríficos (A, B e C).

255

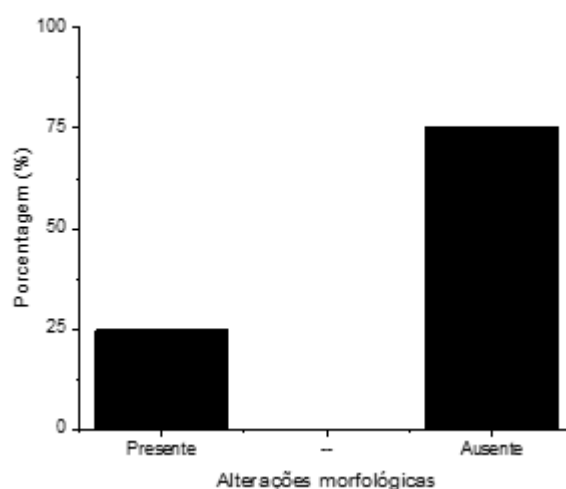


256

257 **Figura 2.** Porcentagem (%) de esplenomegalia encontrados em *Oreochromis niloticus*  
258 cultivadas em sistema de tanque-rede provenientes de diferentes frigoríficos (A, B e C).

259

260



261

262 **Figura 3.** Porcentagem (%) de presença e ausência de alteração morfológica no fígado e  
 263 baço encontrados em *Oreochromis niloticus* cultivadas em sistema de tanque-rede  
 264 provenientes de diferentes frigoríficos (A, B e C).

265

266 **Tabela 1.** Média  $\pm$  erro padrão de massa (g) e comprimento (cm) de *Oreochromis*  
 267 *niloticus* cultivadas em sistema de tanque-rede com presença e ausência de hepatomegalia  
 268 e esplenomegalia. Análise estatística de Anova complementado com o Teste de Kramer-  
 269 Tukey ( $p < 0,05$ ).

Alteração morfológica	Situação	Massa (g)	Comprimento (cm)
Hepatomegalia	Presença	990,75 $\pm$ 39,06 A <sup>1</sup>	29,66 $\pm$ 0,40 A <sup>3</sup>
	Ausência	1.005,78 $\pm$ 21,18 A	30,06 $\pm$ 0,22 A
Esplenomegalia	Presença	1.080,92 $\pm$ 93,17 A <sup>2</sup>	31,50 $\pm$ 1,06 A <sup>4</sup>
	Ausência	1.000,92 $\pm$ 18,86 A	29,94 $\pm$ 0,20 A

270 <sup>1</sup> $p=0,7403$ ; <sup>2</sup> $p=0,3907$ ; <sup>3</sup> $p=0,4442$ ; e <sup>4</sup> $p=0,1526$ .

271