

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS EM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) E
POSSÍVEIS RISCOS EM SAÚDE PÚBLICA

MARIANNA VAZ RODRIGUES

Botucatu – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS EM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) E
POSSÍVEIS RISCOS EM SAÚDE PÚBLICA

MARIANNA VAZ RODRIGUES

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

Orientador: Prof. Dr. Germano Francisco
Biondi

Co-orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo
Júnior

Rodrigues, Marianna Vaz.

Avaliação de protozoários em tilápias (*Oreochromis niloticus*) e possíveis riscos em Saúde Pública / Marianna Vaz Rodrigues. - Botucatu: [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2013

Orientador: Germano Francisco Biondi

Co-orientador: João Pessoa Araújo Júnior

Assunto Capes: 50502000

1. Tilápia - Protozoários - Diagnóstico

Palavras-chave: Ciliophora; *Telotrochidium matiense*; Tilápia; Parasitos; Diagnóstico

Nome do autor: Marianna Vaz Rodrigues

Título: AVALIAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS EM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) E POSSÍVEIS RISCOS EM SAÚDE PÚBLICA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Germano Francisco Biondi

Presidente e 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 Cesar Martins

Membro

Departamento de Morfologia

Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu - SP

Prof Dr Sergio Carmona de São Clemente

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal Fluminense – Niterói - RJ

Prof^a Dr^a Agar Costa Alexandrino de Pérez

Membro

Unidade de Referência de Tecnologia do Pescado

Instituto de Pesca – Santos – SP

Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim

Membro

Unidade Técnica Regional de Agricultura

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Botucatu – SP

Prof Dr Otávio Augusto Martins

Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

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

Prof Dr José Carlos de Figueiredo Pantoja

Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu – SP

Profª Drª Kate Aparecida Buzi

Suplente

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Estadual do Centro-Oeste – Guarapuava – PR

Data de defesa: 03 de dezembro de 2013.

*Dedico este trabalho a Deus e a mãe Maria por sempre
guiarem meus passos e me presentearem com anjos
em minha vida: minha família e namorado.*

Amo vocês!

*“Tudo o que fizerem, façam de todo o coração,
como para o Senhor, e não para os homens.”*

Col 3, 23

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mario e Marcia, por sempre me criarem com imenso amor, me ensinando que todos somos iguais perante Deus e que o nosso dever é sempre trabalhar em prol do próximo. Sou e sempre serei eternamente grata a Deus por ser filha deles, pois como diz na sagrada escritura, somente uma boa árvore rende bons frutos, e espero um dia ser um terço do que eles representam para mim.

Ao meu irmão, Felipe, e minha cunhada Aline, que sempre me apóiam e me enchem de alegria! Amo vocês!

Ao meu namorado, Alberione, pelo total apoio emocional e profissional, não deixando que as adversidades diárias me abalassem no meu trabalho. Além de ser um excelente advogado, me ajudou muito na escrita e revisão do trabalho, por isso, muito OBRIGADA! Agradeço também pelo amor incondicional, sou eterna grata a Deus pela sua presença em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Germano, que sempre esteve ao meu lado me ajudando, apoiando e incentivando não somente no doutorado, mas como na minha carreira. Não poderia deixar de agradecer pelos momentos culturais que jamais esquecerei!

À minha eterna orientadora, Dr^a Agar, que desde o início sempre me incentivou e me ensinou tudo sobre como honrar a nossa profissão. Posso dizer que por isso, e diversos outros motivos, sempre a considerearei como minha mãe científica!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. João Pessoa, pelo apoio incondicional e aprendizado.

Ao Prof. Reinaldo do Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, UNESP, por ter cedido as amostras de tilápia de cultivo.

Ao pessoal da Inspeção Sanitária que sempre me apoiou, principalmente o Ricardo (Curan) e Júlia.

Ao pessoal do laboratório de biologia molecular pelo ensino e companheirismo, principalmente às queridas amigas Taís, Sueli e Jacqueline que além da grande amizade, sempre me ajudaram muito no projeto. Meninas, vocês são muito especiais para mim!

À Val do laboratório de patologia veterinária pela ajuda na montagem das lâminas.

Às meninas do Grupo de Oração Universitário: Meirinha, Rebeca, Bruninha, Alana, Laís e Renata que se tornaram minhas amigas pela fé e minha grande família em Botucatu. Os nossos momentos de

oração foram fundamentais para me fortalecer e conseguir realizar o doutorado. Amo muito vocês!
Viva Jesus e Maria!

À CAPES pela bolsa concedida.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização genética de diversidade de parasitas.....	18
Tabela 2 -	Número de machos e fêmeas, e média de comprimento de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) coletada de aquicultura e pesca.....	29
Tabela 3 -	Alterações macroscópicas observadas durante a necropsia.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	6
Figura 2 -	Principais pólos de produção de tilápia no Brasil.....	8
Figura 3 -	Protozoa: citoesqueleto de microfilamentos de actina, microtúbulos e alvéolos. Exemplos: (A) Amebas (B) Euglenóides (C) Axostilados (D) Heliozoários (E) Ciliados, apicomplexos (F) Dinoflagelados.....	10
Figura 4 -	Protozoa: ciclos de vida. N = haplóide, 2N = diplóide. (A) Ciclo de vida assexuado haplóide: novos indivíduos produzidos diretamente por fissão (mitose), como ilustrado pelos cinetoplastídeos. (B) Ciclo de vida dominante haplóide: dois indivíduos N produzem isogametas mitoticamente, que se fundem para formar um zigoto diplóide. O zigoto, então, sofre meiose para formar indivíduos haplóides. Exemplos incluem os Volvocida, muitos dinoflagelados, axostilados e apicomplexos (esporozoários). (C) Ciclo de vida dominante diplóide: indivíduos 2N produzem gametas N meioticamente, que se fundem para restaurar um indivíduo 2N, como em alguns axostilados, heliozoários, muitas algas verdes, diatomáceas e ciliados (e animais multicelulares). Ciliados, contudo, não formam gametas, mas trocam núcleos haplóides que se fundem. (D) Ciclo de vida co-dominante haplóide-diplóide: indivíduos 2N produzem meioticamente esporos N que se desenvolvem em indivíduos N, os quais, mitoticamente, formam gametas N que se fundem para restaurar organismos 2N; incluiu muitos foraminíferos e muitas algas (e plantas verdes multicelulares).....	12
Figura 5 -	Unidade de piscicultura em tanques-rede na Bacia do rio Grande, reservatório de Água Vermelha, pertencente à Associação de Piscicultores do município de Mira Estrela, Estado de São Paulo, Brasil.....	21
Figura 6 -	Rio Capivari, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil.....	22
Figura 7 -	Exposição de órgãos para inspeção <i>post-mortem</i> de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	24
Figura 8 -	Visualização de filés de tilápia do Nilo em mesa de inspeção <i>candling-table</i>	24
Figura 9 -	Tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) de cultivo apresentando hemorragia.....	32
Figura 10 -	Visualização de alterações macroscópicas em tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>). A: líquido sanguinolento na cavidade celomática. B: congestão gástrica. C: hepatomegalia e hemorragia hepática. D: esplenomegalia e hemorragia	

	esplênica.....	33
Figura 11 -	Tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) com exoftalmia.....	33
Figura 12 -	Tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>) apresentando melanização cutânea (A) e escoliose (seta).....	34
Figura 13 -	Esfregaço sanguíneo com presença de protozoários no citoplasma das hemácias (seta preta). Também se observa vacuolização do citoplasma (seta vermelha). Coloração de Giemsa.....	36
Figura 14 -	<i>Imprint</i> de cérebro (A) e coração (B). Presença de parasitas (seta) no citoplasma das hemácias em ambos os tecidos analisados. Coloração de Giemsa.....	36
Figura 15 -	Presença de oocisto (seta larga), contendo dois esporocistos (seta fina) com dois esporozoítos (S) em fezes de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>). Corados com lugol.....	37
Figura 16 -	A: Presença de cílios (seta fina) e macronúcleo (seta larga) de protozoários encontrados nas fezes. B: Cisto globular com parede fina (seta). Técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco e corado com lugol.....	38
Figura 17 -	Presença de cílios (seta) no protozoário encontrado nas fezes. Técnica de impregnação por prata.....	36
Figura 18 -	Corte histológico de tecido muscular (HE). A: necrose de coagulação (NC). B: necrose de coagulação (NC) e rarefação (R). C: presença de protozoários (seta) e eosinófilos (E). D: necrose de coagulação (NC), colônia bacteriana (seta preta) e presença de protozoários (seta vermelha). E: presença de protozoários (seta vermelha), eosinófilos (E) e colônia bacteriana (seta preta). F: presença de protozoários (seta vermelha) e colônia bacteriana (seta preta).....	39
Figura 19 -	Corte histológico de tecido renal (HE). A: degeneração de túbulos renais (D), congestão (C) e granulomas (G). B: congestão (C), granuloma parasitário com fibrose (seta larga), degeneração de túbulos renais (D) e protozoários (seta fina). C: granuloma com fibrose (F), protozoários (seta preta) e melanomacrófagos (seta vermelha). D: presença de protozoários (seta). E: presença de protozoários (seta fina preta), inclusão intranuclear em linfócitos (seta grossa) e infiltrado inflamatório mononuclear (seta fina vermelha). F: necrose de coagulação (NC), degeneração (D), presença de protozoários (seta), eosinófilos (E) e melanomacrófagos (seta larga).....	40
Figura 20 -	Corte histológico de tecido cardíaco (HE). A: necrose de coagulação (seta) e	

presença de protozoários (P). B: presença de protozoários (seta fina) e colônia bacteriana (seta larga). C: necrose de coagulação (NC) e presença de protozoários (seta). D: necrose de coagulação (NC). E, F: necrose de coagulação (NC) e presença de protozoários (seta)..... 41

Figura 21 - Corte histológico de tecido hepático (HE). A: necrose de coagulação (NC) e presença de nematóide (seta). B: degeneração vacuolar (seta preta), presença de eosinófilos (seta vermelha) e protozoários (seta verde). C: necrose de coagulação (NC) e presença de protozoários (seta). D: necrose de coagulação difusa (NC), presença de protozoários (seta) e eosinófilos (E). E: necrose de coagulação (NC). F: granuloma parasitário com fibrose (seta larga), melanomacrófagos (M) e protozoários (seta fina), e presença de eosinófilos (E)..... 42

Figura 22 - Corte histológico de tecido esplênico (HE). A: presença de melanomacrófagos (seta) e rarefação (R). B: presença de melanomacrófagos (M) e protozoários (seta). C: necrose de coagulação (NC), vacuolização (seta preta) e cistos parasitários (seta branca). D: necrose de coagulação (NC) e cistos parasitários (seta). E: necrose de coagulação (NC), rarefação (R) e granuloma parasitário (seta). F: granuloma parasitário com fibrose (F) e protozoários (seta)..... 43

Figura 23 - Corte histológico de tecido gástrico (HE). A: necrose de coagulação (NC). B: necrose de coagulação (NC) e presença de protozoários (seta). C: necrose de coagulação (NC), presença de eosinófilos (E) e protozoários (seta). D: necrose de coagulação (NC) e presença de protozoários (seta)..... 44

Figura 24 - Corte histológico de tecido entérico (HE). A: necrose de coagulação (NC), presença de eosinófilos (E) e granulomas parasitários (seta). B: presença de eosinófilos (seta preta), protozoários (seta vermelha) e granuloma parasitário com fibrose (F) e protozoários (seta verde). C: presença de eosinófilos (E) e granuloma parasitário com protozoários (seta). D: presença de estruturas basofílicas sugestivas de esquizontes (seta). E: presença de eosinófilos, protozoários (seta preta) e estruturas basofílicas sugestivas de esquizontes (seta vermelha). F. presença de protozoários (seta preta) e estruturas basofílicas sugestivas de esquizontes (seta vermelha)..... 45

Figura 25 - Corte histológico de tecido cerebral (HE). A, B: vacuolização (V) e infiltrado inflamatório mononuclear na camada granulosa (seta). C: vacuolização (seta). D: vacuolização (V) e presença de protozoários (seta)..... 46

Figura 26-	Cultivo celular primário de rim de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>), apresentando protozoário (seta) invadindo a célula renal. Coloração de Giemsa.....	47
Figura 27 -	Presença de protozoário em músculo esquelético. Observa-se núcleo (N) e grânulos densos (seta).....	48
Figura 28 -	Presença de macronúcleo (MA) e micronúcleo (MI) em protozoário coletado do cultivo celular primário de rim de tilápia do Nilo.....	49
Figura 29 -	Presença de protozoários em amostra de cultivo celular primário de rim de tilápia do Nilo. Estruturas não identificadas.....	49
Figura 30 -	Presença de cisto globular com parede fina.....	50
Figura 31 -	Árvore filogenética usando o modelo T92, com 500 repetições <i>bootstrap</i> e inferência bayesiana. Observa-se que a sequência obtida no presente estudo (Contig protozoan) apresenta um ancestral comum com <i>Telotrochidium matiense</i>	52

LISTA DE ABREVIACÕES

2N: diplóide

AFLP: Análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

BLAST: *Basic local alignment search tool*

DMEM: meio Dulbecco modificado por Eagle

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: Desoxinucleotídeo trifosfato

EC: Comunidade europeia (*European Community*)

EDTA: ácido etileno diamino tetra-acético (*Diaminoethanetetraacetic acid*)

FAO: Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura (*Food and Agriculture Organization*)

FasL: receptor do fator de necrose tumoral

F12: mistura de nutrientes

HE: hematoxilina-eosina

IGF: fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin-like growth factor*)

ITS: espaçador interno transcrito (*Internal transcribed spacer*)

LAMP: amplificação circular isotérmica (*Loop mediated isothermal amplification*)

MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MPA: Ministério da Pesca e Aquicultura

N: haplóide

pb: pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PCR-RFLP: Reação em cadeia da polimerase – análise do polimorfismo de fragmentos de comprimento variável obtido por clivagem com enzimas de restrição (*Polymerase chain reaction – Restriction fragment length polymorphism*)

PEAD: Polietileno de alta densidade

PFGE: eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*)

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real-time polymerase chain reaction*)

RAPD: amplificação ao acaso de ácido desoxirribonucleico polimórfico (*Random amplified polymorphic DNA*)

RDA: Análise de diferença representacional (*Representational difference analysis*)

rDNA: Ácido desoxirribonucléico ribossômico

rRNA: ácido ribonucleico ribossômico

SSCP: Polimorfismo conformacional de fita simples (*Singled-strand conformation polymorphism*)

SSU rDNA: subunidade menor do ácido desoxirribonucléico ribossomal (*Small-subunit ribosomal DNA*)

TRAIL: indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	4
2.	REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1	Tilapicultura	6
2.1.1	Tilápia	6
2.1.2	Produção de tilápia no Brasil	7
2.2	Protozoa	9
2.2.1	Protozoários em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	13
2.3	Identificação e caracterização de protozoários.....	15
3.	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivos específicos	20
4.	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Amostragem	21
4.2	Raspado de pele e brânquias	23
4.3	Esfregaço sanguíneo.....	23
4.4	Exame de fezes.....	23
4.5	Necropsia	23
4.6	<i>Imprint</i>	25
4.7	Histopatologia	25
4.8	Cultivo celular.....	25
4.9	Microscopia eletrônica de transmissão	26
4.10	Reação em cadeia da Polimerase, Sequenciamento e Análise filogenética	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6.	COMENTÁRIOS.....	53
7.	CONCLUSÕES	54
8.	ESTUDOS FUTUROS /SUGESTÕES.....	55
9.	BIBLIOGRAFIA	56
10.	TRABALHO CIENTÍFICO.....	65
10.1	Normas da revista: “Emerging Infectious Disease”	65
10.2	Artigo	77

RESUMO

RODRIGUES, M.V. **Avaliação de protozoários em tilápias (*Oreochromis niloticus*) e possíveis riscos em Saúde Pública.** Botucatu, 2013. 99p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies de peixe mais cultivadas no Brasil, além de ser altamente consumida em nível mundial. No entanto, a intensificação do cultivo e o destino inadequado de dejetos propiciam a infecção parasitária de tilápias de rio e de aquicultura. Dentre os parasitos de peixes, os protozoários são os mais frequentes, podendo causar queda na produção e mortalidade dos animais, causando prejuízo econômico. O presente estudo teve como objetivo detectar e caracterizar novos protozoários em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) de aquicultura (Mira Estrela, São Paulo) e pesca extrativa (Botucatu, São Paulo). Foram coletadas 56 amostras de tilápia do Nilo de cultivo e 60 de pesca extrativa e submetidas à necropsia, esfregaço sanguíneo, *imprint*, exame de fezes, histopatologia, microscopia eletrônica de transmissão, PCR, sequenciamento e análise filogenética para detecção e caracterização dos protozoários. Foi encontrada ocorrência de 100% de parasitose em todos os peixes (aquicultura e pesca) e tecidos analisados por todas as técnicas de diagnóstico realizadas. Os principais achados histopatológicos foram presença de granulomas com cápsula fibrosa contendo melanomacrófagos, cistos parasitários e eosinófilos. Pela presença do cisto globular, macronúcleo e micronúcleo, observados na microscopia eletrônica de transmissão, sugere-se que os protozoários pertençam ao filo Ciliophora. Após amplificação do DNA do protozoário pela PCR, análise da sequência e da árvore filogenética foi possível identificar que o protozoário é semelhante e possui ancestral comum com o ciliado *Telotrochidium matiense*, podendo ser o primeiro relato desse grupo de ciliados em peixes.

Palavras-chave: Ciliophora; *Telotrochidium matiense*; Tilápia; Parasitos; Diagnóstico.

ABSTRACT

RODRIGUES, M.V. Evaluation of protozoans in tilapias (*Oreochromis niloticus*) and possible risks in Public Health. Botucatu, 2013. 99p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is highly consumed worldwide and it is the most popular fish in aquaculture in Brazil. However, the intensification and the inappropriate waste destination provide parasitary infection of tilapia from river and aquaculture. Among fish parasites, protozoan are the most common, which can cause decrease of the production and mortality of the animals that leads to economic loss. This study was aimed to detect and characterize novel protozoans in Nile tilapia (*O. niloticus*) from aquaculture (Mira Estrela, São Paulo) and catch (Botucatu, São Paulo). It was sampled 116 Nile tilapias, which 56 were from aquaculture and 60 from river. They were submitted to necropsy, blood smear, imprint, faeces analysis, histopathology, transmission electron microscopy, PCR, sequencing, and phylogeny for detection and characterization of protozoan found. Parasitism was detected in 100% of fishes analyzed by all diagnostic techniques performed in tissues. The main findings were granuloma with fibrous capsule containing macrophages, parasites cysts, and eosinophils. Considering globular cyst with thin wall, macronucleus and micronucleus presence in transmission electron microscopy, it could be inferred that the protozoan found can belong to Ciliophora phylum. After amplification of protozoan DNA by PCR, sequencing, and phylogenetic analysis, it was possible to identify that the protozoan that was found infecting tilapias were similar and had common ancestor with *Telotrochidium matiense*. This is the first report of this group of ciliate in fish.

Key words: Ciliophora; *Telotrochidium matiense*; Tilapia; Parasites; Diagnostic.

1. INTRODUÇÃO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies de peixes cultivadas com maior sucesso nos países da América Latina. Isso deve-se ao seu poder de adaptação e alta produtividade. Inicialmente, seu cultivo tinha apenas o objetivo de suprir a alimentação da população rural, sendo que atualmente é comercializada para diversos países, dentre eles, os Estados Unidos (WURMANN, 2010).

A tilapicultura começou na América Latina em 1970 no México e rapidamente alcançou 10.000 toneladas em 1981 (81% do México e 19% de Cuba). Em 1996, a produção atingiu 50.000 toneladas (26 países) e no ano de 2007 a produção foi de 212.000 toneladas, tendo como principais produtores, o Brasil, Honduras, Colômbia, Equador e Costa Rica (WURMANN, 2010).

Dados do Ministério da Pesca e Aquicultura, demonstraram queda na pesca extrativa de tilápia (10.087,9 toneladas em 2008, 9.246,6 toneladas em 2009 e 9.610,3 toneladas em 2010), enquanto que a produção apresentou aumento significativo (111.145,3 toneladas em 2008, 132.958,3 toneladas em 2009 e 155.450,8 em 2010). Em relação à aquicultura, a tilápia é uma das espécies mais cultivadas no Brasil, sendo uma “commodity” importante para a economia do setor (BRASIL, 2012).

Devido à capacidade de adaptação da tilápia aos parâmetros: temperatura da água, oxigênio dissolvido e qualidade da água, esta espécie é encontrada em todos os microclimas existentes no estado de São Paulo, desde as regiões mais frias do vale do Paraíba até os mais quentes do Noroeste Paulista. Entretanto, há regiões em que esta espécie se adaptou melhor e que aliado à consolidação da cadeia produtiva (produtores de alevinos, fábricas de ração e demais fornecedores de insumos), fez com que estas regiões se tornassem verdadeiros pólos de produção, como o Noroeste Paulista, Médio Paranapanema e Vale do Paraíba (SUSSEL, 2011).

A intensificação do cultivo de peixes propicia aumento de matéria orgânica, levando a eutrofização da água, por exemplo. Dentre os prejuízos da alta densidade populacional, pode-se citar estresse dos animais com consequente surgimento de doenças e sua disseminação. As parasitoses são as enfermidades mais relatadas devido à resistência da tilápia aos possíveis patógenos presentes. No entanto, na literatura há diversos relatos de ectoparasitas, ciliados como *Trichodina* spp. e *Chilodonella* spp.,

monogenéticos como *Dactylogyrus* e *Gyrodactylus*, e apicomplexos como *Goussia* que possuem apenas impacto para a saúde animal. Em contrapartida, o filé de tilápia possui amplo consumo *in natura* após a captura, sem inspeção sanitária prévia, podendo expor o consumidor a patógenos que ainda são desconhecidos e podem apresentar potencial zoonótico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tilapicultura

2.1.1 Tilápia

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1) pertence à família Cichlidae e é uma espécie nativa da África que foi introduzida em diversos países, como Japão, Tailândia, México e Brasil. Esta ampla distribuição é decorrente da capacidade de adaptação, principalmente em relação à temperatura de cultivo que pode variar 16 a 30°C (SURESH, 2003; PHILIPPART & RUWET, 1982).



Figura 1. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Ocorre em um amplo habitat de água doce, tais como rios, lagos, canais de esgoto e de irrigação (BAILEY, 1994). É uma espécie com hábito diurno e onívoro, utilizando como maior fonte alimentar fitoplânctons, zooplânctons e animais da fauna bentônica, o que reduz sensivelmente o consumo de ração balanceada (COLDEBELLA et al., 2012). Atingem 62 cm de comprimento e peso de 3,650 kg (Food and Agriculture Organization - FAO, 2012a,b; FISHBASE, 2012). São ovíparos e os ovos produzidos são armazenados na boca das fêmeas para proteção contra predadores, até as larvas serem liberadas e o vitelo ser reabsorvido, obtendo alta taxa de fecundidade e

nascimento das larvas (COLDEBELLA et al., 2012; TREWAVAS, 1983; BREDER & ROSEN, 1966).

2.1.2 Produção de tilápia no Brasil

A tilápia (*Tilapia rendalli*) foi introduzida no Brasil em 1952 e a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na década de 1970, por ser uma espécie de fácil criação (adaptação e resistência a diversos agentes patogênicos) e reprodução (PIEROBOM, 2009). No entanto, até 1970, era vista como uma praga, devido à alta reprodução, porém após esse período atingiu o mercado consumidor. Isto foi devido às características do produto, ou seja, apresenta filé branco, sem espinhas e de sabor suave (FRANCO, 2006; SURESH, 2003). Além da carne, um subproduto de alto valor comercial é o couro (processo de curtimento), principalmente para o mercado internacional. A carcaça, vísceras, cauda e as escamas, podem servir de alimento para outros animais (aves, suínos) e como adubo para a agricultura. A cartilagem pode ser utilizada para a fabricação de óleo de peixe (SEBRAE, 2008).

A pesca artesanal mostra alguns indicadores de extração de tilápias dos rios, mas sua dimensão é insignificante, diante da produção pela aquicultura continental (SEBRAE, 2008). Em 2010, a produção aquícola nacional de tilápia foi de 470.399 toneladas (394.340 toneladas de aquicultura continental e 85.058,6 toneladas de aquicultura marinha), representando um incremento de 15,3% em relação ao ano de 2009. Avaliando-se os anos de 2009 e 2010, observou-se um aumento de 16,9% da produção continental (337.353 toneladas em 2009 para 394.340 toneladas em 2010). Este acréscimo pode ser decorrido do desenvolvimento do setor, pela ampliação de políticas públicas que facilitaram o acesso aos programas governamentais existentes, tais como o Plano Mais Pesca e Aquicultura, desenvolvido pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) (BRASIL, 2012).

A região Sul do Brasil (estado de Rio Grande do Sul) foi o maior produtor (aquicultura continental), com 33,8% da produção nacional, seguido pelas regiões: nordeste (19,92%), sudeste (17,98%), centro-oeste (17,71%) e norte (10,54%). A tilápia (155.450,8 toneladas em 2010) e a carpa (94.579 toneladas em 2010) foram as espécies mais cultivadas, representando 63,4% da produção continental nacional (BRASIL, 2012).

A tilapicultura no Brasil está dividida basicamente em três pólos: Nordeste, Noroeste do Estado de São Paulo e Oeste do Paraná (Figura 2). O pólo do Nordeste é

compreendido por duas regiões: os reservatórios do rio São Francisco na região de Paulo Afonso (Bahia) e os grandes açudes do estado do Ceará (Castanhão, Orós e Sítios Novos). No entanto, o pólo do oeste do Paraná, apresenta a produção de tilápias no sistema de tanques escavados. No estado de São Paulo, o maior pólo de produção de tilápias está localizado no Noroeste Paulista, principalmente a região de Santa Fé do Sul, reservatórios do rio Paraná, rio Grande e baixo rio Tietê. Há tendência de expansão nos reservatórios de Furnas e Três Marias (Minas Gerais), e também no reservatório Serra da Mesa (Goiás), possibilitando a criação de outro pólo de produção (SUSSEL, 2011).



Figura 2. Principais pólos de produção de tilápia no Brasil

Fonte: Sussel, 2011

O sistema de produção mais praticado no estado de São Paulo é o de tanques-rede, instalados em reservatórios de usinas hidroelétricas. Entretanto, algumas pisciculturas já estão adequando suas instalações para produzir nos mesmos sistemas utilizados na salmonicultura do Chile, ou seja, tanques em PEAD (Polietileno de Alta Densidade), com máquina de despesca, classificador e alimentadores automáticos. Estima-se que atualmente a produção paulista é em torno de 1.500 toneladas/mês de

tilápias. O Noroeste Paulista corresponde por volta de 65% da tilápia produzida no Estado de São Paulo (SUSSEL, 2011).

Em 2010, os Estados Unidos foi o principal comprador dos produtos brasileiros de pescado, em volume e em valor, seguido pela Espanha e França. Os principais produtos exportados são camarões, lagostas e peixes congelados (BRASIL, 2012). No entanto, o Brasil possui um alto volume de importação, principalmente da Noruega (bacalhau salgado), Argentina (filé de merluza congelado) e Chile (salmão fresco e congelado) (SEBRAE, 2008).

2.2 Protozoa

Os protozoários são organismos unicelulares, móveis (cílios, flagelos ou pseudópodes) e eucarióticos. Protozoa é um táxon polifilético com limite não estabelecido. O alimento entra no vacúolo por meio de fagocitose, frequentemente por uma boca celular definida (citóstoma) (YAEGER, 1996; CORLISS, 2001; RUPPERT et al., 2005). Algumas espécies se alimentam de tegumento, e outras penetram o epitélio, sendo encontradas em outros órgãos (NOGA, 2010).

Do número total de espécies de protistas, um pouco menos do que a metade (cerca de 92.000) são protozoários, um quarto dos quais vivem como simbioses de outros organismos. Os protozoários parasitas, por outro lado, têm um enorme impacto sobre os seres humanos: milhões de pessoas morrem anualmente de malária e outros protozoários parasitas adoecem e matam gado, aves, peixes, e organismos silvestres. Esses prejuízos econômicos causam perdas de centenas de milhões de dólares anualmente (RUPPERT et al., 2005). Em animais aquáticos, os protozoários que são ectoparasitas afetam frequentemente peixes de cultivo, porém também podem ser encontrados em peixes de vida livre (MACMILLAN, 1991).

O corpo do protozoário é geralmente limitado apenas pela membrana celular (Figura 3). A rigidez ou flexibilidade do corpo e a sua forma são dependentes do citoesqueleto, que tipicamente está localizado bem abaixo da membrana celular. O citoesqueleto e a membrana celular em conjunto formam a película, um tipo de “parede corporal” dos protozoários. O citoesqueleto compõe-se quase sempre de filamentos proteicos (actina, por exemplo), microtúbulos, vesículas (tais como, alvéolos), ou de combinações de todos os três. Os filamentos proteicos podem formar uma malha densa no citoplasma mais próximo à superfície. As estruturas mais conspícuas do citoesqueleto são os microtúbulos peliculares que ocorrem nos flagelados,

apicomplexos e ciliados. Eles podem-se arranjar como um colete microtubular ou, como em alguns flagelados, os microtúbulos podem originar-se nos corpos basais flagelares, os quais irradiam para trás até a extremidade oposta da célula como um tipo de esqueleto axial (axóstilo). Em outros protozoários, tais como os radiolários e os heliozoários esféricos, os feixes de microtúbulos irradiam-se a partir de um centroplasto no centro da célula e, então, se estendendo para o interior e suportando uma projeção em forma de raio da superfície da célula (axópode) (YAEGER, 1996; RUPPERT et al., 2005).

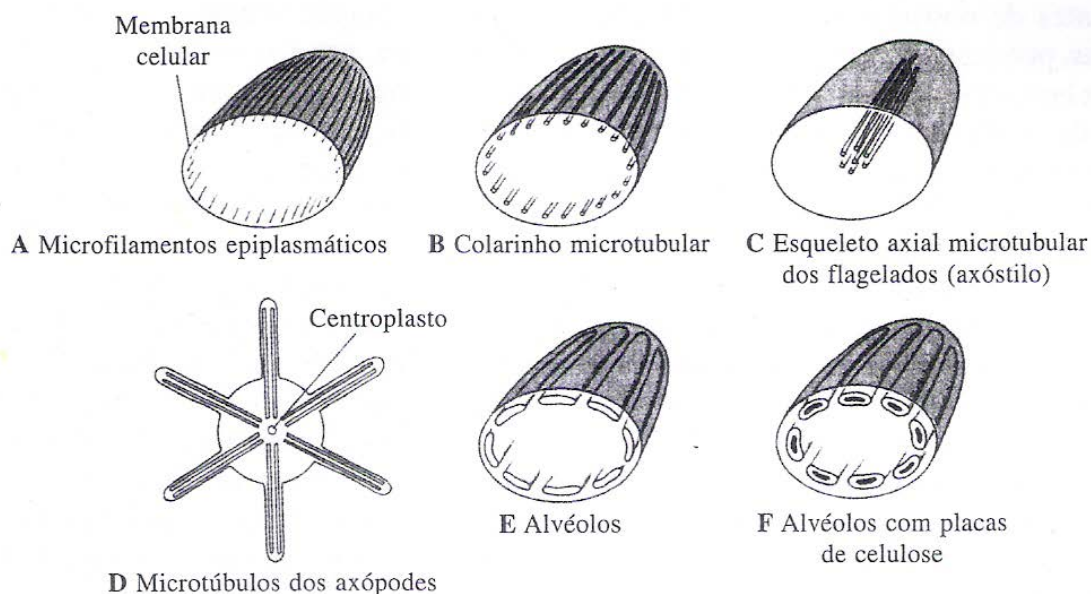


Figura 3. Protozoa: citoesqueleto de microfilamentos de actina, microtúbulos e alvéolos. Exemplos: (A) Amebas (B) Euglenóides (C) Axostilados (D) Heliozoários (E) Ciliados, apicomplexos (F) Dinoflagelados

Fonte: Ruppert et al., 2005

A maioria dos protozoários é aeróbica, que depende da difusão para a tomada de oxigênio e liberação de CO_2 . Alguns protozoários, contudo, são anaeróbios obrigatórios, especialmente os que vivem como simbiontes no trato digestivo dos animais (RUPPERT et al., 2005).

A reprodução clonal (assexuada) por mitose ocorre na maioria dos protozoários e é o único modo conhecido de reprodução em algumas espécies. Com poucas exceções, a reprodução clonal envolve replicação das organelas antes ou após uma fissão. A membrana nuclear não se desfaz durante a mitose e o fuso se forma dentro do próprio núcleo. À medida que separam os cromossomos, o núcleo intacto se alonga e, então, se

constringe, separando dois novos núcleos (processo denominado fuso fechado). Intermediários entre fuso fechado e aberto ocorrem nas clorófitas (*Cglamydomonas*, *Volvox*) e apicomplexos. Nestes táxons, a membrana nuclear permanece bastante intacta, mas aberturas ocorrem permitindo que os microtúbulos citoplasmáticos do fuso penetrem no núcleo e se prendam nos cromossomos (YAEGER, 1996; RUPPERT et al., 2005).

A reprodução sexuada também pode ocorrer (produção de gametas, formação do oocisto e esporozoítos infectantes) e apresentam ciclo de vida diversificado. As três formas gerais de ciclo de vida de sexuais nos protozoários são dominância haplóide, dominância diplóide e co-dominância haplóide-diplóide (Figura 4). Um ciclo de vida dominante haplóide inclui indivíduos haplóides, que tanto se transformam em gametas ou realizam mitose. A fusão dos gametas haplóides resulta em um zigoto diplóide, que logo sofre meiose para formar quatro novos indivíduos haplóides. Este ciclo é típico em apicomplexos. Em um ciclo de vida dominante diplóide, os indivíduos $2N$ sofrem meiose para produzir gametas N (ou núcleos gaméticos), que se fundem em um indivíduo zigoto $2N$. Este tipo de ciclo de vida ocorre nos ciliados. No ciclo de vida co-dominante haplóide-diplóide, uma geração assexuada (N ou $2N$) se alterna com uma geração sexuada ($2N$ ou N). Esse padrão é característico dos foraminíferos (plantas) (YAEGER, 1996; RUPPERT et al., 2005).

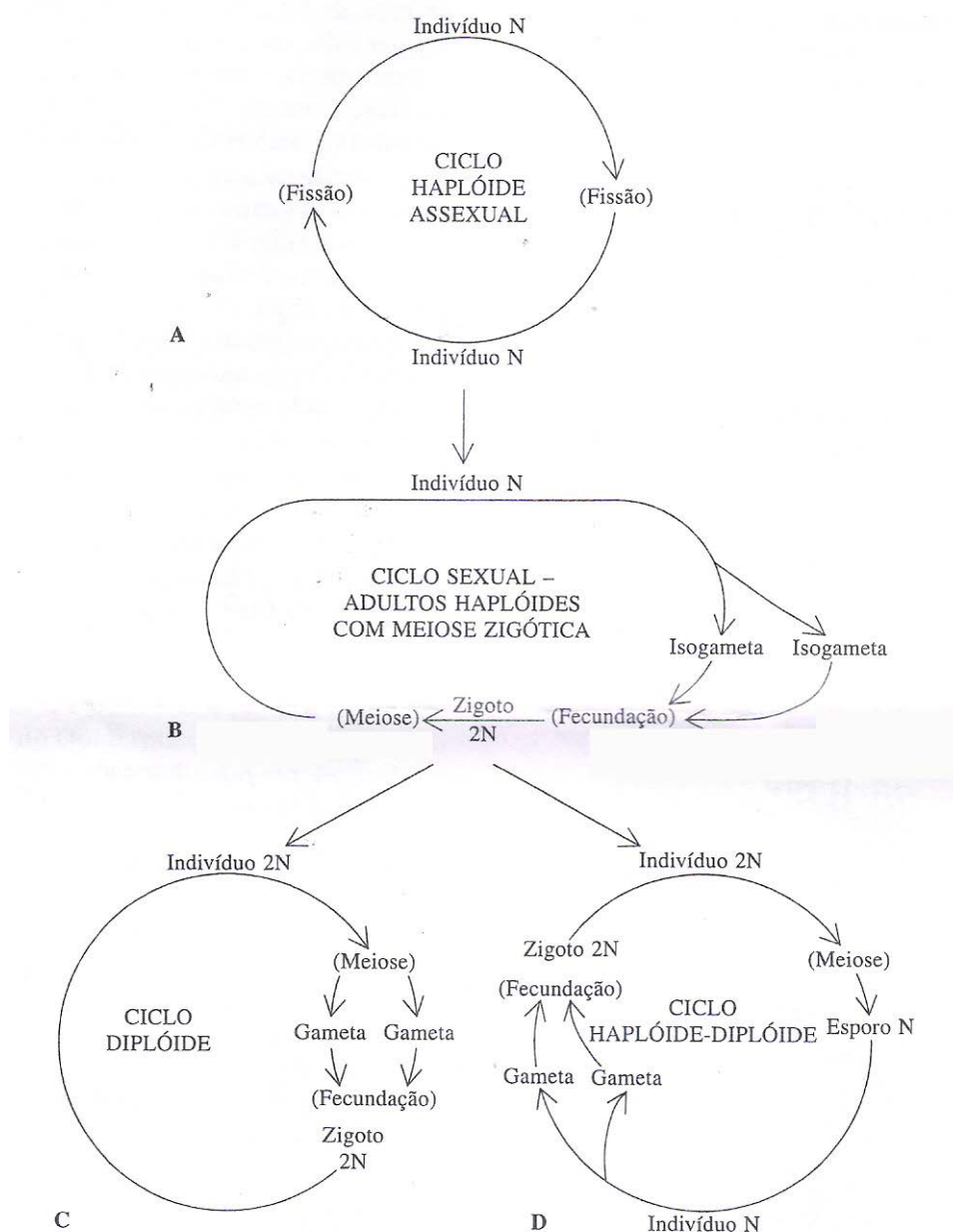


Figura 4. Protozoa: ciclos de vida. N = haplóide, $2N$ = diplóide. (A) Ciclo de vida assexuado haplóide: novos indivíduos produzidos diretamente por fissão (mitose), como ilustrado pelos cinetoplastídeos. (B) Ciclo de vida dominante haplóide: dois indivíduos N produzem isogametas mitoticamente, que se fundem para formar um zigoto diplóide. O zigoto, então, sofre meiose para formar indivíduos haplóides. Exemplos incluem os Volvocida, muitos dinoflagelados, axostilados e apicomplexos (esporozoários). (C) Ciclo de vida dominante diplóide: indivíduos $2N$ produzem gametas N meioticamente, que se fundem para restaurar um indivíduo $2N$, como em alguns axostilados, heliozários, muitas algas verdes, diatomáceas e ciliados (e animais multicelulares). Ciliados, contudo, não formam gametas, mas trocam núcleos haplóides que se fundem.

(D) Ciclo de vida co-dominante haplóide-diplóide: indivíduos $2N$ produzem meioticamente esporos N que se desenvolvem em indivíduos N , os quais, mitoticamente, formam gametas N que se fundem para restaurar organismos $2N$; incluem muitos foraminíferos e muitas algas (e plantas verdes multicelulares)

Fonte: Ruppert et al., 2005

Durante o ciclo de vida, o protozoário passa por diversos estágios que diferem quanto à estrutura e função. Trofozoíto é o termo da fase reprodutiva e ativa da maioria dos protozoários que está associada à patogenia. Em hemoflagelados, as formas amastigota, promastigota, epimastigota e tripomastigota designam estágio de trofozoítos que diferem quanto à presença ou ausência do flagelo e da posição do cinetoplasto com o flagelo. Dessa forma, existem diversas formas infectantes de protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa, tais como taquizoíto e bradizoíto (*Toxoplasma gondii*), oocisto (*Cryptosporidium* spp.), etc. Além disso, alguns protozoários formam cistos que contém uma ou mais formas infectantes (YAEGER, 1996).

Para formar o cisto, o protozoário secreta um envelope espessado ao redor de si mesmo e fica inativo. Dependendo da espécie, o cisto protetor é resistente à dessecação ou a baixas temperaturas, além de permitir que a célula atravesse por condições ambientais desfavoráveis. O ciclo de vida mais simples inclui duas fases: uma fase ativa e uma fase encistada, protetora. No entanto, os ciclos de vida mais complexos se caracterizam frequentemente por zigotos encistados ou pela formação de cistos reprodutivos especiais, nos quais ocorre fissão, gametogênese ou acontecem outros processos reprodutivos (RUPPERT et al., 2005).

Os protozoários podem se dispersar por longas distâncias tanto nos estágios móveis como nos encistados. As correntes de água, o vento, lama, detritos nos corpos de aves aquáticas e de outros animais, constituem agentes comuns de dispersão (RUPPERT et al., 2005).

2.2.1 Protozoários em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Uma diversidade de protozoários pode ser encontrada em peixes. No entanto, a patogenicidade está associada à imunidade do hospedeiro, densidade populacional, qualidade da água, espécie e quantidade de parasitas (MACMILLAN, 1991; BANU & KHAN, 2004; LIZAMA et al., 2007; MARTINS et al., 2010; MARTINS et al., 2011). Sistemas de cultivo intensivo apresentam diversos problemas relacionados à infecção

por protozoários, levando, muitas vezes, à queda de produção, mortalidade (parasitismo e infecção secundária) e prejuízo econômico para o aquicultor (PANTOJA et al., 2012).

Os protozoários que são ectoparasitas de peixes são divididos em: oportunistas com baixo poder de adaptação para persistir no hospedeiro (*Ophryogelan* spp., *Tetrahymena* spp., *Hemiohryns* spp. e *Glaucoma* spp.); ubíquos que são bem adaptados, porém sem especificidade de hospedeiro e local de infestação (*Ichtyobodo necator*, *Chilodonella hexasticha*, *Chilodonella cyprinii*, *Amyloodinium ocellatum*, *Piscicodinium pillulare*, *Ichthyophthirius multifiliis* e *Cryptocaryon irritans*); e espécies altamente especializadas com especificidade de hospedeiro e local de infestação (*Trichodina* spp.) (HOFFMANN, 1978; PAPERNA, 1991). Além de causarem alterações de epitélio, como hiperplasia, necrose, fusionalamento de filamentos branquiais, também são bons indicadores de contaminação ambiental, uma vez que ocorre aumento desses parasitas em água eutrofizada (PAPERNA, 1991).

No Brasil, existem poucos estudos taxonômicos de protozoários em piscicultura. No entanto, há relatos de protozoários externos que causam desde erosão das nadadeiras até mortalidade. Pádua et al. (2013) descrevem a morfologia de *Chilodonella hexasticha*, tricodinídeos e *Epistylis* spp. em tilápias do Nilo, provenientes de piscicultura do município de Palotina, Paraná. Assim como esses autores, Ghiraldelli et al. (2006) e Martins e Ghiraldelli (2008) também encontraram tricodinídeos em tilápias cultivadas na região sul do Brasil. No estado de São Paulo, há diversos trabalhos que também descrevem a presença dos mesmos protozoários citados por esses autores em tilápias (TAVARES-DIAS et al., 2001). Embora esses parasitas tenham predileção por epiderme e filamentos branquiais, causam anorexia e mortalidade, responsável pela queda na produção (anorexia, mortalidade) significativa, ocasionando prejuízo econômico para o consumidor.

Em relação aos endoparasitas, os coccídeos causam mortalidade gradual devido à cronicidade da doença em peixes. Podem ser encontrados, em tilápias, os coccídeos *Cryptosporidium* e *Eimeria* (LANDSBERG & PAPERNA, 1986, 1987; PAPERNA, 1991; ELI et al., 2012). Ghoneim et al. (2012) encontraram *Giardia duodenalis* em 2,9% das tilápias do Nilo (*O. niloticus*), provenientes de cultivo e do rio Nilo, de Cairo, Giza e El-Fayium, no Egito. Tanto os gêneros *Cryptosporidium*, *Eimeria* quanto a espécie *Giardia duodenalis* têm potencial zoonótico.

Levando-se em consideração os que não causam doença no homem, podem-se citar diversos gêneros, dentre eles, *Hexamita*, *Goussia* e *Calyptospora* (PAPERNA,

1991; ELI et al., 2012). El-Mansy (2008) encontrou prevalência de 41% da espécie *Goussia cichlidarum*, parasitando células epiteliais de bexiga natatória, de tilápias do Nilo (*O. niloticus*), de pisciculturas e do rio Nilo, no Egito. O autor observou, por meio da histopatologia, degeneração, hipertrofia, proliferação celular, necrose e fibrose. Neste caso, o impacto será exclusivamente para os animais, porém pode ocasionar alto índice de mortalidade.

2.3 Identificação e caracterização de protozoários

No século XVII, com o desenvolvimento da microscopia, o cientista holandês Antony van Leeuwenhoek foi o pioneiro na descoberta de protozoários como causadores de doenças. O controle efetivo em doenças causadas por protozoários é baseado em testes de diagnóstico rápidos e com alta sensibilidade. Atualmente, a microscopia é amplamente utilizada para identificação de protozoários que causam doenças em animais. No entanto, estudos recentes em biologia molecular auxiliam no desenvolvimento de novas ferramentas para detecção de protozoários (WAAL, 2012).

Segundo Thomson et al. (2005) não existem chaves de identificação para protozoários (ciliados, flagelados, heliozoários e amebas) de fácil utilização e atualizadas, decorrente da ocorrência de muitas espécies não descritas, outras mal descritas e a falta de acordo entre os taxonomistas quanto à posição exata de diversos organismos desse grupo.

As técnicas utilizadas na taxonomia de protozoários são baseadas em microscopia óptica e/ou microscopia eletrônica (diferentes métodos para cada grupo a ser estudado). As estruturas externas e internas, como genitália, musculatura, órgãos e glândulas fornecem informações para identificação taxonômica. As amostras “a fresco” são ideais para este fim, pois somente neste caso são obtidas informações, como movimentação, presença de pseudópodo, entre outras, embora apresente baixa sensibilidade. Para aumentar a sensibilidade, pode-se concentrar a amostra ou fazer várias lâminas para leitura. Nesta etapa da análise é aconselhada a obtenção de fotografias e desenhos (CORLISS, 2001; THOMSON et al., 2005; WAAL, 2012). Devido à baixa sensibilidade da microscopia óptica com amostra “a fresco”, foram desenvolvidos outros testes de diagnóstico, tais como testes sorológicos e baseados na detecção de ácidos nucleicos (WAAL, 2012). Outro agravante é que algumas espécies não podem ser diferenciadas apenas pela observação de estruturas pela microscopia

óptica. Apesar dessa limitação, a morfologia é o principal método de identificação de parasitas (MCMANUS & BOWLES, 1996).

A microscopia eletrônica é uma técnica importante para investigação de doenças causadas por protozoários, uma vez que a microscopia óptica apresenta algumas limitações. No entanto, é necessário realizar outros testes de diagnóstico para a correta identificação do patógeno (CURRY, 2003).

Os testes sorológicos são úteis para rápida identificação e para o imunodiagnóstico. As técnicas imunológicas podem ser usadas para caracterização de isolados e a fim de estimar o grau de relação entre organismos (MAXON & MAXON, 1990; MCMANUS & BOWLES, 1996). Dentre as técnicas de detecção de anticorpos, pode-se citar: fixação de complemento, imunodifusão, hemaglutinação indireta, aglutinação por látex, imunofluorescência indireta, imunoradiensaio e ensaio de imunoadsorção enzimática. No entanto, a presença de anticorpos não significa que o protozoário estará no organismo, pois mesmo após a sua eliminação, os anticorpos persistem por um longo período. Outro agravante destes testes é que podem apresentar reação cruzada entre espécies de parasitas. Para resolver este problema, alguns pesquisadores e laboratórios estão desenvolvendo testes de detecção do antígeno de parasitas (WAAL, 2012).

Durante a última década, as técnicas moleculares têm sido estabelecidas para monitoramento de populações parasitárias como parte do sistema de vigilância (TODRYK & HILL, 2007). Têm sido realizadas diversas análises de apicomplexos para estabelecer parâmetros, incluindo diversidade genética, dinâmica de infecção e estrutura populacional. A similaridade entre os padrões da biologia básica e doença ou transmissão entre esses parasitas continuam a promover discussões e comparações epidemiológicas e de testes metodológicos (BRAKE, 2002; TARDIEUX & MENARD, 2008).

Segundo Savin et al. (2004), as técnicas moleculares (detecção de ácidos nucléicos e proteínas) também estão sendo utilizadas atualmente para identificação de protozoários, porém não tornam os métodos tradicionais de identificação obsoletos. Entretanto, Corliss (2001) relata que as técnicas moleculares permitem investigações taxonômicas minuciosas, além de possuírem maior sensibilidade e especificidade que os métodos convencionais. Dessa forma, contribui para um maior entendimento referente à patogenicidade, taxonomia, fonte de infecção, transmissão, etc. (TRAUB et al., 2005).

Como exemplos de técnicas aplicáveis à identificação e caracterização de protozoários por ferramentas moleculares, pode-se citar: eletroforese de enzimas multiloco que é um método de caracterização de organismos, obtido pela mobilidade relativa de diversas enzimas intracelulares em uma eletroforese, correlacionando a diferença de mobilidade à diferença de alelos do gene para a enzima em questão; “Southern blot” que é baseada na digestão de fragmentos de DNA (ácido desoxirribonucleico) com uma ou mais enzimas de restrição e separadas por eletroforese, sendo depois transferidas para uma membrana e hibridizada com sondas complementares; DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD – *Random amplified polymorphic DNA*) que identifica regiões do DNA que são polimórficas entre espécies de parasitas; reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase chain reaction*) que amplificará a região alvo do DNA do parasita com um par de iniciadores, sendo usado para detecção e genotipagem; PCR em tempo real (qPCR – *Real-time polymerase chain reaction*) que é mais sensível que a PCR convencional, reduz a contaminação cruzada, permite diferenciar os fragmentos de DNA pela análise da curva de *melting* e quantificar o agente detectado; amplificação circular isotérmica (LAMP – *Loop mediated isothermal amplification*) que usa seis diferentes iniciadores para seis distintas áreas do DNA, onde será amplificado o produto somente se houver a ligação em todas as regiões; sequenciamento por capilar, *microarrays* e em tempo real (*Pyrosequencing*) que permitem maior informação, auxiliando na identificação de novas variantes, além de servir como base para desenvolvimento de novos ensaios específicos pela PCR (SOUTHERN, 1975; BARNABÉ et al., 2000; MONIS et al., 2005; TRAUB et al., 2005; BOUZID et al., 2008; WAAL, 2012).

Diversas tecnologias estão sendo desenvolvidas para identificar e caracterizar patógenos. Algumas utilizam chip ou biosensores para amplificação, hibridização ou interação entre receptor e o ligante. Outros utilizam ionização e dessorção a laser assistida por matriz para identificar patógenos baseado na detecção de proteínas, porém é necessário um banco de dados. Existem alguns testes disponíveis comercialmente para diagnóstico parasitológico, no entanto, requerem equipamento especializado e banco de dados atualizado (LAY, 2001; DEMIREV et al., 2004).

Monis et al. (2005) relatam que a escolha da região e loco, e o teste a ser utilizado, dependerá da dúvida em questão. Regiões altamente conservadas podem fornecer informações taxonômicas entre espécies, enquanto que regiões conservadas moderadamente podem diferenciar cepas e espécies próximas; regiões variáveis

moderadamente informam quanto à estrutura genética da população, enquanto regiões altamente variáveis permitem rastreamento de um isolado em uma população; e mapeamento de marcadores genéticos pode ser usado para encontrar marcadores que correlacionem genótipo e fenótipo (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização genética de diversidade de parasitas^{a,b}

Função	Objetivo	Ferramentas
Discriminação em nível de espécie	Taxonomia e filogenia	Regiões de codificação altamente conservadas, como subunidade de rDNA e alguns genes mitocondriais
Discriminar entre espécies	Taxonomia, diagnóstico e epidemiologia	Regiões conservadas moderadamente, como genes mitocondriais, ITS rDNA
Discriminar entre variantes, cepas e genótipos intraespecíficos	Genética populacional, sistemas de criação, especificidade de hospedeiro, epidemiologia molecular, conservação e biosegurança	Regiões variáveis, como alozimas, RAPD, AFLP, PFGE e PCR-RFLP
Discriminação entre isolados individuais, linhagens de clones e subgenótipos, e interações ecológicas com o hospedeiro	<i>Fingerprinting</i> e epidemiologia molecular	Técnicas de <i>fingerprinting</i> , como minissatélites, microsatélites e SSCP
Marcadores genéticos, e vinculação com fenótipo e genótipo	Identificação de fenótipos de importância clínica e epidemiológica, incluindo virulência, infectividade e sensibilidade a medicamentos	Genótipo correlacionado ao fenótipo por mapas genéticos, RDA, e sequenciamento e/ou PCR em tempo real de genes que estão correlacionados com fenótipos

^a Dependendo do parasita estudado e o nível de variação que é detectado, pode ocorrer sobreposição entre as ferramentas usadas (regiões do DNA) e função (Modificado de Thompson, 2004).

^b Abreviaturas: rDNA: DNA ribossômico; AFLP: polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (*amplified-fragment-length polymorphism*); ITS: espaçadores internos transcritos (*internal transcribed spacer*); PCR-RFLP: reação em cadeia da polimerase – polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (*PCR-coupled restriction-fragment-length polymorphism*); PFGE: eletroforese em campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*); RAPD: DNA pleomórfico amplificado ao acaso (*random amplified polymorphic DNA*); RDA: análise de diferença representacional (*representational difference analysis*); SSCP: polimorfismo de conformação de fita simples (*single-strand conformation polymorphism*).

Fonte: Monis et al., 2005.

Segundo McManus e Bowles (1996), os métodos baseados na detecção de ácidos nucleicos são mais adequados para determinar a genética dos organismos estudados. Outra vantagem é que o sequenciamento de DNA permite o exame direto do genoma independente de influências ambientais e ontogenética. Uma vez que o produto foi sequenciado, essa informação sempre estará disponível para futuros estudos.

Beck et al. (2009) recomendam que futuras pesquisas dêem mais ênfase na ampla diversidade nas formas clínicas de apresentação em humanos e animais, associação entre perfis genéticos e virulência ou outros aspectos patológicos. O completo sequenciamento do genoma dos apicomplexos e outros protozoários fornecerão mais marcadores polimórficos e permitirá análises futuras das estruturas populacionais. Dessa forma, será possível usar essas informações na estrutura, dinâmica e diversidade populacional para se obter intervenções com sucesso.

3. OBJETIVOS

Detectar, identificar e caracterizar novos protozoários em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) de aquicultura (Mira Estrela, São Paulo) e pesca extrativa (Botucatu, São Paulo).

3.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os níveis de parasitoses por protozoários, descrever as principais lesões macroscópicas e microscópicas pelas técnicas: *imprint*, esfregaço sanguíneo, exame histopatológico e exame de fezes.
- ✓ Isolar os protozoários com auxílio do cultivo celular primário de rim das tilápias coletadas.
- ✓ Identificar morfologicamente (ultraestrutura) em microscópio eletrônico de transmissão.
- ✓ Amplificar os segmentos gênicos pela PCR utilizando iniciadores que reconhecem regiões conservadas de protozoários seguidas de seqüenciamento e análise filogenética.
- ✓ Escolher primers internos para região sequenciada (SSU rRNA) para utilização no diagnóstico dessa espécie.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

As amostras de tilápias provenientes da aquicultura foram coletadas com auxílio de rede, bimestralmente, de forma aleatória, durante o período de março de 2010 a março de 2011, na Bacia do rio Grande, reservatório de Água Vermelha, na Associação de Piscicultores do município de Mira Estrela (Figura 5), Estado de São Paulo, Brasil ($19^{\circ}55'47.52''$ S, $50^{\circ}08'36.56''$ O).



Figura 5. Unidade de piscicultura em tanques-rede na Bacia do rio Grande, reservatório de Água Vermelha, pertencente à Associação de Piscicultores do município de Mira Estrela, Estado de São Paulo, Brasil

Fonte: Zago, 2012

As amostras de tilápias de pesca extrativa foram obtidas aleatoriamente, diretamente com os pescadores (captura com rede de pesca artesanal), bimestralmente, de novembro de 2010 a novembro de 2011, do rio Capivari, no município de Botucatu (Figura 6), Estado de São Paulo, Brasil ($22^{\circ}43'43''$ S, $48^{\circ}22'29''$ O).



Figura 6. Rio Capivari, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil

Foram coletados 116 peixes adultos, de 20 a 50 cm de comprimento, com peso de 200 a 500 g, da espécie tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Destes, 56 foram provenientes de aquicultura do reservatório de Água Vermelha (Mira Estrela, São Paulo) e 60 de pesca extrativa do rio Capivari (Botucatu, São Paulo).

Após a coleta, os peixes foram identificados, acondicionados em sacos plásticos lacrados e enviados para o Laboratório de Inspeção Sanitária de Alimentos de Origem Animal do Departamento de Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal e Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia (Instituto de Biociências), pertencentes à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, para realização da necropsia, inspeção *post-mortem*, raspado de pele e brânquias, *imprint*, esfregaço sanguíneo, exame de fezes, análise histopatológica, microscopia eletrônica de transmissão, PCR, sequenciamento e análise filogenética para identificação dos parasitos, respectivamente.

4.2 Raspado de pele e brânquias

Os animais vivos foram submetidos ao raspado de pele e brânquias quando estes apresentavam melanose cutânea e hemorragia. Para tanto, foi feito o raspado na base das nadadeiras peitorais e das brânquias com lâmina de vidro limpas. O material foi colocado em uma lâmina e diluído com a água do viveiro e do rio para observação dos parasitos em microscopia óptica comum nos aumentos de 40 e 100X.

4.3 Esfregaço sanguíneo

Os animais vivos foram insensibilizados em água contendo gelo conforme as diretrizes do código de ética do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Em seguida foram colocados na mesa de necropsia para coleta do sangue. As seringas e agulhas continham 0,2 mL de EDTA 3% para evitar a coagulação. As seringas foram inseridas na região caudal a 45° em direção à região ventral da coluna vertebral (artéria e veia caudal) para aspiração. Após a coleta, o material foi acondicionado em frascos com EDTA e armazenado em geladeira até o uso.

Para o esfregaço foi colocada nas lâminas (preparadas da mesma maneira que para o *imprint*) uma gota de aproximadamente 5 µL, seguidos de coloração por Giemsa. A visualização foi feita em microscopia óptica comum no aumento de 100X.

4.4 Exame de fezes

As fezes foram coletadas com auxílio de sonda uretral nos animais vivos. Para tanto, os animais foram insensibilizados em água contendo gelo, colocados na mesa de necropsia para coleta das fezes. Devido a suspeita de Sarcocystidae, o material foi submetido à técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco para pesquisa de oocistos (FAUST et al., 1938). A esporulação dos possíveis oocistos foi realizada conforme descrito por Raether et al. (1995). Para pesquisa de protozoários ciliados foi feita a impregnação por prata que auxilia na visualização dos cílios e identificação de estruturas internas (FERNÁNDEZ-GALIANO, 1994).

4.5 Necropsia

A necropsia foi feita de acordo com o método descrito por Moeller Jr. (2012). Primeiramente foi realizada incisão próxima ao poro urogenital até a coluna, seguida de corte até a região peitoral. O plastrão foi removido para visualizar presença de parasitas na cavidade abdominal (Figura 7). Em seguida, os peixes foram filetados e observados

em mesa de inspeção *candling table* (Figura 8) para pesquisa de parasitas e /ou cistos parasitários.



Figura 7. Exposição de órgãos para inspeção *post-mortem* de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)



Figura 8. Visualização de filés de tilápia do Nilo em mesa de inspeção *candling-table*

Durante a necropsia foram anotadas todas as alterações macroscópicas externas e internas, bem como coleta de amostras para microscopia eletrônica de transmissão (sangue, coração e músculo), histopatologia (cérebro, coração, rim, estômago, intestino, fígado, baço e musculatura) e PCR (músculo, sangue e cérebro).

4.6 *Imprint*

Durante a necropsia foram feitos *imprints* de cérebro e coração para pesquisa de protozoários. As lâminas eram colocadas em um recipiente contendo detergente (Extran 2%) por um período 4 horas, lavadas em água corrente para remoção dos resíduos e passadas para um frasco contendo álcool 70%, onde permaneceram por um período de 4 horas. Em seguida, as lâminas foram secas em estufa (37°C) e fixadas em metanol *overnight*. Posteriormente foi realizado o *imprint* e as lâminas coradas com Giemsa e visualizadas em microscópio óptico comum no aumento de 100X.

4.7 **Histopatologia**

Após inspeção *post-mortem*, as amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas, seguida de desidratação, diafanização, emblocagem e montagem de lâminas. Foi utilizada a coloração de hematoxilina/eosina conforme descrito por Junqueira e Carneiro (2004) para observar a presença de protozoários e lesões decorrentes do parasitismo. Devido ao exame histopatológico ser um teste que não permite a completa identificação de protozoários foram realizadas outras técnicas de diagnóstico (microscopia eletrônica de transmissão, PCR, seqüenciamento e análise filogenética).

4.8 **Cultivo celular**

Inicialmente, o rim foi coletado assepticamente e acondicionado em um frasco contendo o meio DMEM de alta glicose que contém aminoácidos (glicina, glutamina, metionina, leucina, fenilalanina, entre outros), vitaminas (ácido fólico, riboflavina, niacinamida, entre outros), sais inorgânicos (cloreto de cálcio, nitrato férrico, sulfato de magnésio, bicarbonato de sódio, entre outros), dextrose e vermelho de fenol. Para evitar a contaminação das células por algum micro-organismo presente no animal foram adicionados estreptomicina e penicilina.

Para digestão adequada do tecido foi utilizada collagenase tipo I a 0,2% (Invitrogen®). Em seguida o material foi filtrado e acondicionado em um tubo contendo meio DMEM de alta glicose (40%), F12 (40%), soro fetal bovino (20%), estreptomicina (1%), penicilina (1%) e 10ng/mL de IGF (fator de crescimento). O material foi centrifugado a 800 g/ 5 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida as células foram resuspendidas em meio DMEM F12 e transferidos para a placa de 6 poços de

cultivo celular contendo 0,2% de polielilisina. Para aderência e formação do “tapete”, a placa foi mantida em estufa de 5% de CO₂ a 37°C.

O material foi visualizado em microscópio invertido e após 7 dias, o mesmo foi coletado com instrumental estéril para observação em microscopia óptica comum no aumento de 100X e no microscópio eletrônico de transmissão. Também foi feita coloração de Giemsa da mesma maneira que descrito para os procedimentos de *imprint* e esfregaço sanguíneo, seguidos de observação em microscopia óptica comum no aumento de 100X.

4.9 Microscopia eletrônica de transmissão

O sangue, coração e o músculo destinados à microscopia eletrônica foram fixados em Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2.5% e tampão cacodilato 0.2M pH 7.2) (RUDNICKI, 2004). Em seguida, foram submetidos às etapas de desidratação, inclusão, emblocagem e contrastação por acetato de uranila conforme descrito por Attias (2007). A observação de ultra-estruturas foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão CM100 (Philips®), seguida de fotodocumentação.

4.10 Reação em cadeia da Polimerase, Sequenciamento e Análise filogenética

Após a necropsia, o cérebro e fragmentos de músculo foram congelados e mantidos em freezer -70°C (Thermo electron corporation® 902) até o uso. Para extração do DNA desses órgãos foi pesado 20 mg de tecido e o material foi acondicionado em um microtubo livre de ácidos nucleicos, contendo 500 µL de tampão (50 mM EDTA, 50 mM Tris e 150 mM NaCl, pH 8.0), 60 µL de 10% SDS e 25 µL de ribonuclease A (10 ml⁻¹). Em seguida as amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento (-70°C por 4 horas e 20°C por 4 horas), digeridos com 10 µL de proteinase K (10 mg/mL) a 60°C por 1 hora e lavados com os tampões do kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA®) de acordo com as recomendações do fabricante. A eluição foi feita com água livre de ácidos nucleicos previamente aquecida a 50°C e o produto obtido foi armazenado em freezer -20°C até o uso. A quantificação foi feita pelo fluorímetro Qubit® e a relação de pureza foi medida pelo espectrofotômetro Nanodrop® 2000.

O sangue mantido na geladeira (5°C) foi extraído com o kit Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Kit (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do

fabricante. O DNA eluído foi quantificado com auxílio do fluorímetro Qubit®, a relação de pureza foi medida pelo espectrofotômetro Nanodrop® 2000, sendo posteriormente armazenado em freezer -20°C até o uso.

Para a PCR foram utilizados os iniciadores: SFC-340f: 5'AGT-TTC-TGA-CCT-ATC-AGC3' e SFC-1260r: 5'TCA-GCC-TTG-CGA-CCA-TAC-TC3', complementares à região SSU rRNA (KRISTMUNDSSON et al., 2011). A amplificação foi realizada com o mix da *Platinum®Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®) nas seguintes concentrações: 1X de tampão, 0.2mM de dNTP, 1.5mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0.2μM dos iniciadores (SFC-340f e SFC-1260r), 1 unidade de *Platinum®Taq DNA Polymerase* e 3 μL do DNA extraído. Como controle positivo foi utilizado: cepa RH de *Toxoplasma gondii* (obtida de líquido peritoneal de camundongo com 40 dias de vida do biotério da UNESP de Botucatu) e como controle negativo, água livre de ácidos nucleicos. Como controle interno foi utilizado músculo de tilápia do Nilo que foi negativa para os testes realizados durante a necropsia (*imprint*, exame de fezes, esfregaço sanguíneo), histopatologia e PCR.

As condições para a reação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 52°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min com extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1.5% contendo Syber Safe (Invitrogen®), após revelação pela luz ultravioleta.

Após a amplificação, o DNA foi purificado com o kit *Ilustra Microspin™ 5-400 HR Columns* (GE Healthcare®) de acordo com as recomendações do fabricante. A reação para sequenciamento foi realizada com *Big Dye Terminator Chemistry* (Applied Biosystems®), seguido de eletroforese em capilar (Applied Biosystems, ABI 3500®). A qualidade dos eletroferogramas foi feita pelo software *Sequencing Analysis*, alinhadas no *Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 1.5. Para identificação da espécie, as sequências foram comparadas com o banco dados do *Genbank*.

Após sequenciamento, foram desenhados iniciadores internos (Senso: 5' TAG-GCC-TTG-CTG-GAC-CAT-TT 3' e Antisenso: 3' AGC-CAC-CAA-TCT-TTC-TCC-GTT 5'), com a finalidade de verificar se o produto amplificado pelos iniciadores (SFC-340f e SFC-1260r) foram específicos para o agente. O mix e as condições de reação foram iguais, sendo posteriormente sequenciados da mesma forma.

Foram utilizadas para a construção da árvore filogenética, as sequências que apresentaram similaridade significativa com a região reconhecida pelos iniciadores

SFC-340f e SFC-1260r. Os agentes que alinharam foram: *Cryptosporidium* spp., *Perkinsus*, Eimeriidae, *Telotrochidium matiense*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi*, *Besnoitia besnoti* e *Sarcocystis* spp. O algoritmo CLUSTAL_W (MEGA software version 5.1) foi usado para alinhar as sequências com os parâmetros de penalidades de abertura e extensão de “gaps”, os quais foram ajustados manualmente para se obter os melhores alinhamentos. As sequências que apresentaram regiões ambíguas foram manualmente editadas usando o programa MEGA (version 5.1).

O programa MEGA recomendou o modelo T-92 para a sequência obtida pelo presente estudo como o melhor modelo evolutivo. Para tanto, os parâmetros utilizados para a análise foram: nst=6, distribuição gama para verificar a variação de taxa entre os sítios e a proporção de sítios invariáveis (invgamma). Os dados usados para a análise filogenética foram: nossa sequência (Contig Protozoan), *Toxoplasma gondii* JF810959, *Neospora caninum* GQ899205, *Hammondia hammondi* EU025023, *Besnoitia besnoiti* JF314861, *Sarcocystis* spp. AB251613, *Cryptosporidium* spp. GQ227481, *Perkinsus* AF042707, Eimeriidae EF023730 e *Telotrochidium matiense* EF417835. Como raiz foi utilizada a sequência da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) XM_003440881.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras de aquicultura, observou-se maior frequência de machos (Tabela 2), pois a empresa realiza inversão sexual como medida de controle populacional.

Tabela 2. Número de machos e fêmeas, e média de comprimento de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) coletada de aquicultura e pesca

Origem	Espécie	Machos (n)	Fêmeas (n)	$\bar{x}$ comprimento	Total
Aquicultura ¹	Tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	53	3	16.00 cm	56
Pesca ²	Tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	24	36	20.36 cm	60

¹ Bacia do Rio Grande, reservatório de Água Vermelha, Mira Estrela, São Paulo

² Rio Capivari, Botucatu, São Paulo

Tanto os peixes de cultivo quanto de pesca apresentaram ocorrência de 100% de parasitose, e por essa razão, não foi possível identificar o sexo, comprimento e origem, como fatores de risco para a infecção e desenvolvimento dos protozoários encontrados. Este achado sugere que o agente não tem predileção quanto às características citadas acima. Entretanto, Ghoneim et al. (2012) relataram que a prevalência de *Giardia duodenalis* foi maior em peixes (tilápia do Nilo – *O. niloticus* e tainha – *Mugil cephalus*) de vida livre (4.5% - 2/44) do que de criação (2.1% - 1/48). Os autores supõem que essa diferença pode ter sido devido à amostragem, pois os peixes analisados de rio foram na sua maioria alevinos, fase de vida do animal que estão mais suscetíveis à infecção devido à capacidade do sistema imune em combater o agente etiológico ser menor que em indivíduos adultos.

Devido à pequena quantidade de trabalhos publicados com protozoários em peixes descrevendo sua morfologia, ciclo biológico, patogenia, epidemiologia e métodos de diagnóstico, fica dificultada a comparação dos resultados obtidos no presente estudo com a literatura. Este trabalho tinha como primeiro objetivo pesquisar nematóides da família Anisakidae em tilápia do Nilo tanto de aquicultura quanto de

pesca devido a sua importância em Saúde Pública. No entanto, foram encontrados diversos protozoários em todos os órgãos, causando diversas lesões. Com isso, o projeto foi reformulado para identificar esses parasitos, uma vez que a prevalência encontrada foi de 100% em ambas as origens. Vale ressaltar que recentemente foi feito um alerta rápido da Suécia no site Megapesca source (<http://www.gisl.co.uk/Megapesca>) sobre a observação de um protozoário semelhante ao *Sarcocystis* spp. em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) que foi a suspeita inicial do presente trabalho nas tilápias. A autoridade sanitária da Suécia está formando um grupo de estudo para identificar esses protozoários e recomendou ao consumidor que evite o consumo *in natura* por se desconhecer se este agente tem impacto em saúde pública. Esse relato se torna preocupante, pois se os protozoários que estão infectando as tilápias forem os mesmos das trutas, o controle será difícil por estar atingindo mais de uma espécie de ambientes e localidades diferentes.

Embora não tenha sido observada sazonalidade, pesquisadores relatam que alguns protozoários são mais patogênicos nas estações de verão devido ao estresse térmico dos peixes (KUPERMAN & MATEY, 1999). No entanto, outros estudiosos relatam alto parasitismo no inverno (TAVARES-DIAS et al., 2001; BANU & KHAN, 2004; PÁDUA et al., 2013). Com isso, pode-se sugerir que em condições extremas de temperatura (muito calor ou muito frio) há aumento do estresse nos animais, comprometendo a imunidade inata e adquirida dos mesmos (BOWDEN et al., 2007) e tornando-os suscetíveis às infecções parasitárias.

A imunossupressão pode ocorrer como consequência da anorexia induzida pelo parasitismo (KYRIAZAKIS et al., 1998). A queda na imunidade ocorre pela redução da capacidade proliferativa de linfócitos ou pela habilidade fagocitária de macrófagos, induzindo a apoptose de leucócitos do hospedeiro, ou pela exaustão de fatores da imunidade humoral inata (SITJÁ-BOBADILLA, 2008).

Quando o animal se encontra sadio, os protozoários usam os seguintes mecanismos para impedir a ação do sistema imune (SITJÁ-BOBADILLA, 2008):

- Produção de proteínas supressoras de citocinas, neuropeptídeos e proteínas do sistema complemento.
- Expressão limitada do complexo de histocompatibilidade I e II.

- Expressão celular de moléculas, como FasL e TRAIL: fatores relacionados à necrose tumoral que induzem a apoptose de células do sistema imune.

Uma das formas mais observadas de proteção contra o sistema imune do hospedeiro é a formação de cistos. O organismo produz uma cápsula fibrosa que contém melanomacrófagos e fibroblastos (diversas amostras do presente estudo apresentaram este tipo de alteração histológica como descrito posteriormente). Esse mecanismo, além de auxiliar na sobrevivência do parasita, também propicia na disseminação do agente, pois após o hospedeiro parasitado ser consumido por outro peixe, haverá rompimento da cápsula fibrosa e do cisto pela ação enzimática gástrica e intestinal, levando a liberação do protozoário viável (SITJÁ-BOBADILLA, 2008).

Os protozoários intracelulares possuem mecanismos de defesa especializados contra a célula do hospedeiro. Esses mecanismos podem ser: inibição da fusão de fagossomos e lisossomos, resistência a ação enzimática do hospedeiro (produz proteases inibitórias de enzimas do hospedeiro) e saída dos vacúolos fagocíticos. Outra forma de defesa é a produção ou liberação de substâncias que modulam a secreção de citocinas. Este processo ocorre pela interferência de polissacarídeos nos receptores celulares de açúcar e do sistema complemento, bem como nas células apresentadoras de antígeno (SITJÁ-BOBADILLA, 2008).

A ocorrência de 100% dos parasitas neste estudo pode estar relacionada a fatores de estresse (não avaliados nesta pesquisa), tais como a qualidade da água (parâmetros físico-químicos inadequados, quantidade de matéria orgânica, resíduos de produtos químicos, medicamentos e ração), contaminantes químicos e, no caso da aquicultura, manejo inadequado. Diversos trabalhos demonstram que a qualidade da água está diretamente relacionada ao estresse dos peixes, tornando-os susceptíveis aos patógenos presentes na água devido ao desequilíbrio da tríade epidemiológica (PAPERNA, 1991; KUPERMAN & MATEY, 1999; TAVARES-DIAS et al., 2001; BANU E KHAN, 2004; MORAES & MARTINS, 2004; RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004; MORLEY, 2012; PANTOJA et al., 2012; PÁDUA et al., 2013).

Avaliando-se a área de captura das tilápias no rio Capivari, Botucatu, sabe-se que há contaminação química por pesticidas. Há citricultura próxima, com sabida aplicação de praguicidas. Isso acarreta transporte dos pesticidas até as camadas mais profundas do solo, processo denominado lixiviação, que contamina rios, lençóis

freáticos e mares e também resíduos domésticos (os ribeirinhos descartam os lixos domésticos e vísceras de peixes diretamente no rio), podendo justificar o alto índice de parasitismo. Este achado pode ser justificado pelo estudo feito por Morley (2012) que observou redução da atividade fagocítica leucocitária associada à presença de contaminantes químicos (metais pesados) na água. Por outro lado, a alta densidade populacional e qualidade de água deficiente, podem ter sido os fatores que desencadearam a alta parasitose.

Durante a necropsia, foram observadas diversas alterações em todos os animais, dentre elas, hemorragia (Figura 9), tanto externamente quanto de órgãos internos, aumento de tamanho de fígado e baço (Figura 10), exoftalmia (Figura 11) e melanização cutânea (Figura 12, Tabela 3). Alguns trabalhos realizados sobre patogenia de protozoários em peixes descrevem lesões semelhantes às encontradas neste estudo. Dentre elas, pode-se citar escoliose (mixosporídeos), hemorragia (microsporídeos, ciliados e tripanosomatídeos), ascite (microsporídeos), granulomas (ciliados, mixosporídeos, microsporídeos e apicomplexos), hipertrofia/atrofia (mixosporídeos) e necrose (mixosporídeos e apicomplexos) (BRUNO et al., 2006; ELI et al., 2012; PÁDUA et al., 2013). Em decorrência da observação de melanização cutânea foram feitos esfregaços de pele e brânquias, não apresentando nenhum parasito. Quando os peixes apresentavam opacidade de córnea também foi feita pesquisa de diplostomídeo em microscopia óptica comum, resultando negativo.



Figura 9. Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) de cultivo apresentando hemorragia

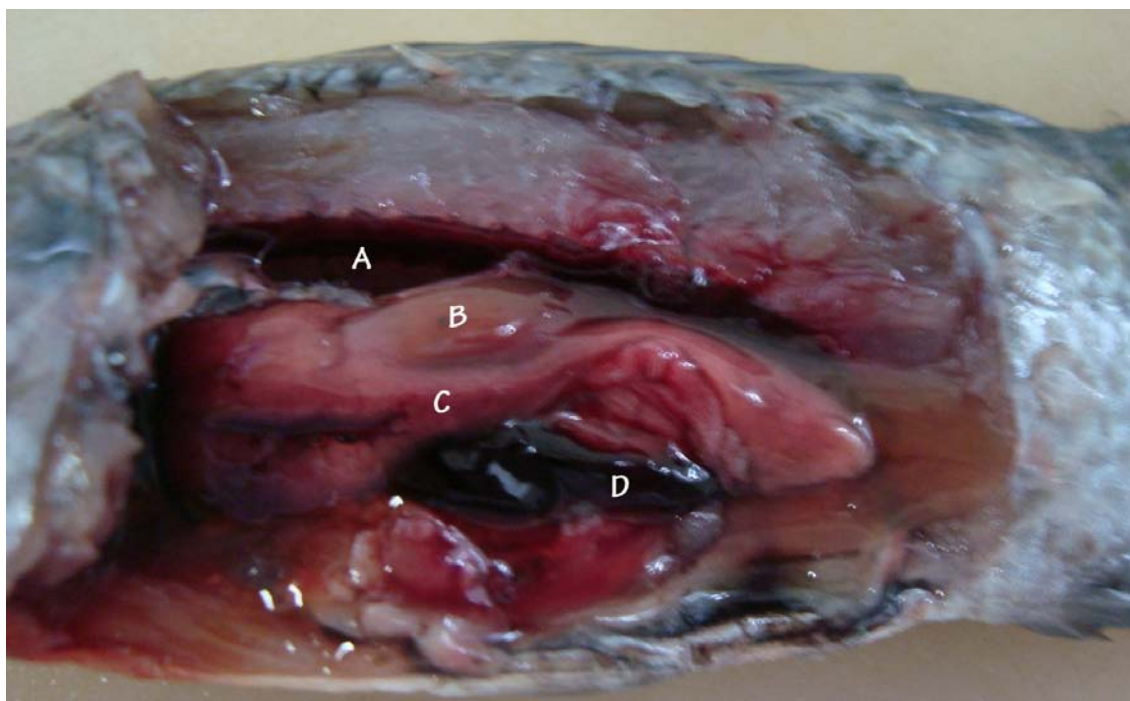


Figura 10. Visualização de alterações macroscópicas em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) de aquicultura. A: líquido sanguinolento na cavidade celomática. B: congestão gástrica. C: hepatomegalia e hemorragia hepática. D: esplenomegalia e hemorragia esplênica



Figura 11. Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) com exoftalmia (seta)

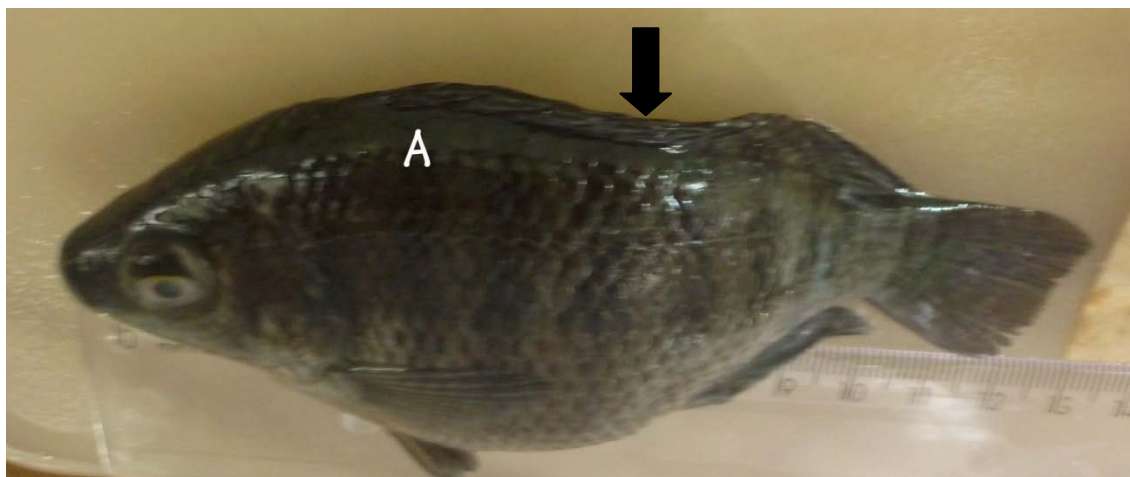


Figura 12. Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) apresentando melanização cutânea (A) e escoliose (seta)

Tabela 3. Alterações macroscópicas observadas durante a necropsia de tilápias do rio e de cultivo

Aquicultura		Pesca	
Lesões externas			
Exoftalmia	5.35% (3/56)	Exoftalmia e endoftalmia	11.66% (7/60)
Hemorragia	53.57% (30/56)	Hemorragia	88.33% (53/60)
Melanização cutânea	58.92% (33/56)	Melanização cutânea	0.00% (0/60)
Nadadeiras erodidas	100.00% (56/56)	Nadadeiras erodidas	16.66% (10/60)
Grande quantidade de muco na pele	1.78% (1/56)	Grande quantidade de muco na pele	0.00 % (0/60)
Opacidade de córnea bilateral	57.10% (32/56)	Opacidade de córnea bilateral	1.66% (1/60)

Lesões internas

Aderência de órgãos	1.78% (1/56)	Aderência de órgãos	0.00% (0/60)
Ascite hemorrágica na cavidade celomática	0.00% (0/56)	Ascite hemorrágica na cavidade celomática	20.00% (12/60)
Esplenomegalia	26.78% (15/56)	Esplenomegalia	26.66% (16/60)
Granulomas hepáticos	1.78% (1/56)	Granulomas hepáticos	0.00% (0/60)
Hemorragia	39.28% (22/56)	Hemorragia	88.33% (53/60)
Hepatomegalia	60.71% (34/56)	Hepatomegalia	68.33% (41/60)
Hipertrofia esplênica	0.00% (0/56)	Hipertrofia esplênica	5.00% (3/60)
Icterícia hepática e entérica	8.92% (5/56)	Icterícia hepática e entérica	1.66% (1/60)
Isquemia hepática	0.00% (0/56)	Isquemia hepática	11.66% (7/60)
Necrose hepática e entérica	0.00% (0/56)	Necrose hepática e entérica	26.66% (16/60)

No esfregaço sanguíneo e *imprint* foram observados protozoários no citoplasma das hemácias (Figuras 13 e 14). Dentre os protozoários que acometem hemácias em animais aquáticos se destacam as *Haemogregarina*, porém estes possuem tamanho e formato diferentes (EIRAS et al., 1995) em comparação ao protozoário encontrado no presente trabalho, sugerindo que possa ser um novo agente.

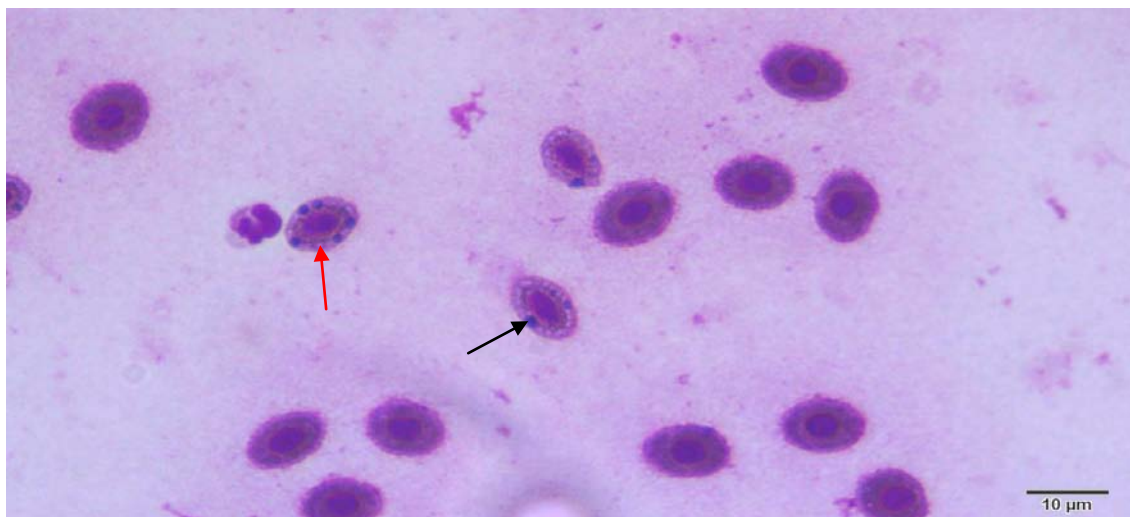


Figura 13. Esfregaço sanguíneo com presença de protozoários no citoplasma das hemácias (seta preta). Também se observa vacuolização do citoplasma (seta vermelha). Coloração de Giemsa

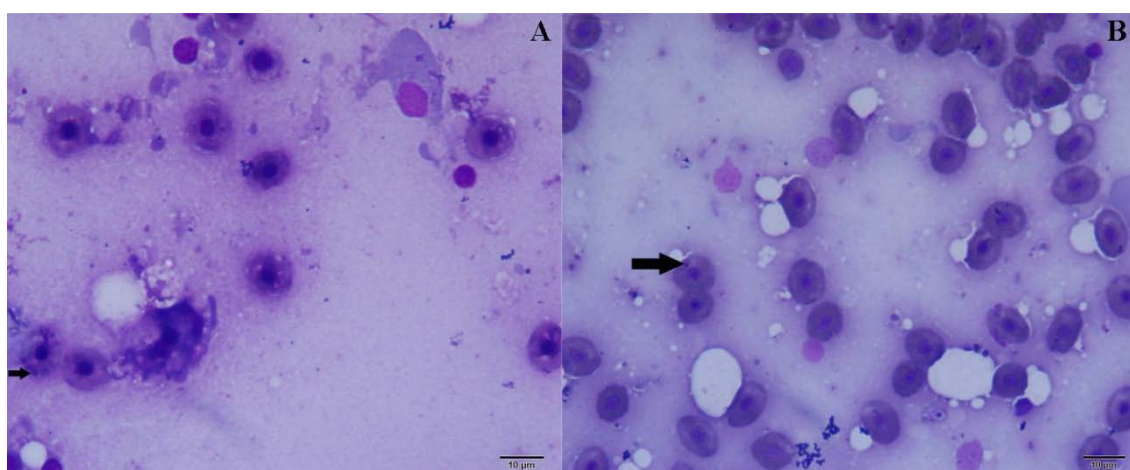


Figura 14. *Imprint* de cérebro (A) e coração (B). Presença de parasitas (seta) no citoplasma das hemácias em ambos os tecidos analisados. Coloração de Giemsa

No exame de fezes de oito animais foram observados oocistos não esporulados e alguns em esporogonia (Figura 15), sugestivo de *Isospora* ou qualquer outro coccídeo que possa formar dois esporocistos contendo dois esporozoítos. Devido ao local de captura dos peixes (rio Capivari, Botucatu) apresentarem inúmeras aves piscívoras, a hipótese seria que esses animais poderiam estar veiculando estes protozoários para os peixes, uma vez que foi observada grande quantidade de fezes desses animais próximos ao rio. Wettere (2012) descreve um protozoário chamado *Atoxoplasma* spp. que causa lesões similares às encontradas nos peixes analisados, em aves, como esplenomegalia,

hepatomegalia e necrose, podendo ser detectados no sangue e em *imprint* de órgãos, corroborando com os achados deste estudo. No entanto, na análise das fezes por microscopia óptica comum e PCR não foi encontrado nenhum protozoário. Por outro lado, também foram observadas estruturas circulares com uma membrana externa delgada contendo diversos cílios. Para confirmação se esta estrutura se tratava de um protozoário, as fezes dos animais foram submetidas à técnica de centrifugo-flutuação de Faust et al. (1938) e impregnado por prata conforme descrito por Fernández-Galiano (1994). Em ambos os métodos foram observados protozoários ciliados (Figuras 16 e 17) em grande quantidade, propondo então que o agente causador da parasitose seja o ciliado e não o apicomplexo, devido à infecção dos coccídios terem ocorrido em apenas oito amostras, caracterizando apenas um achado.

Ainda avaliando as estruturas encontradas no protozoário ciliado, observou-se um cisto com parede fina muito semelhante ao descrito por Martín-Cereceda et al. (2007). Este parasito relatado por esses autores é ciliado e da espécie *Telotrochidium matiense*. Até o momento não há descrição deste protozoário em animais, apenas em lodo e bioreatores.

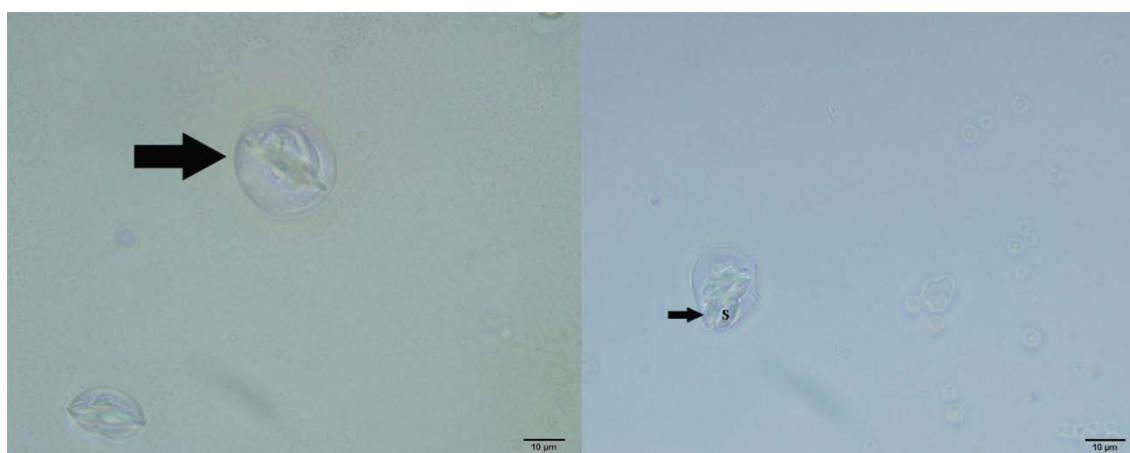


Figura 15. Presença de oocisto (seta larga), contendo dois esporocistos (seta fina) com dois esporozoítos (S) em fezes de tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Corados com lugol

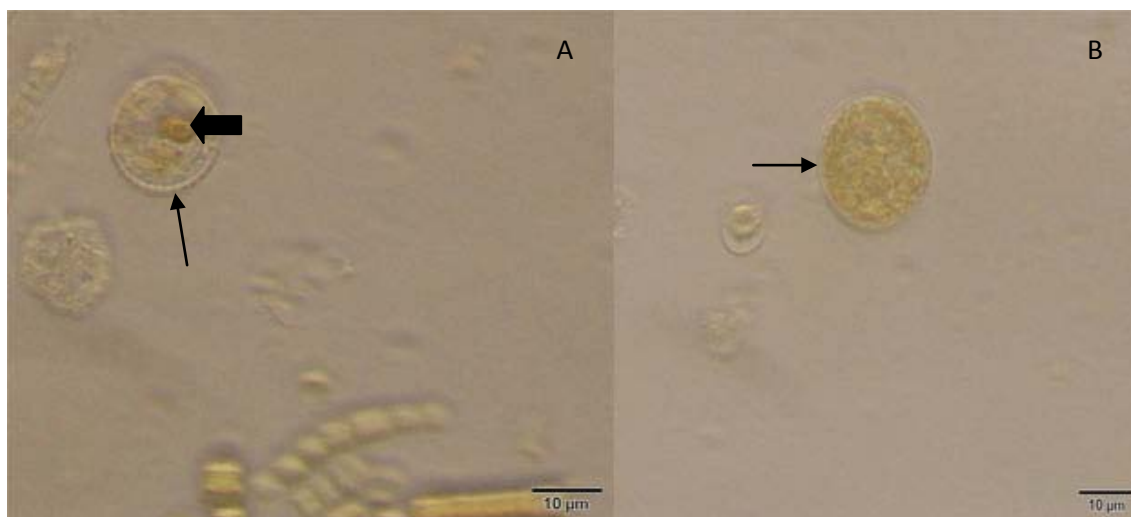


Figura 16. A: Presença de cílios (seta fina) e macronúcleo (seta larga) de protozoários encontrados nas fezes. B: Cisto globular com parede fina (seta). Técnica de centrífugo-flutuação com sulfato de zinco e corado com lugol

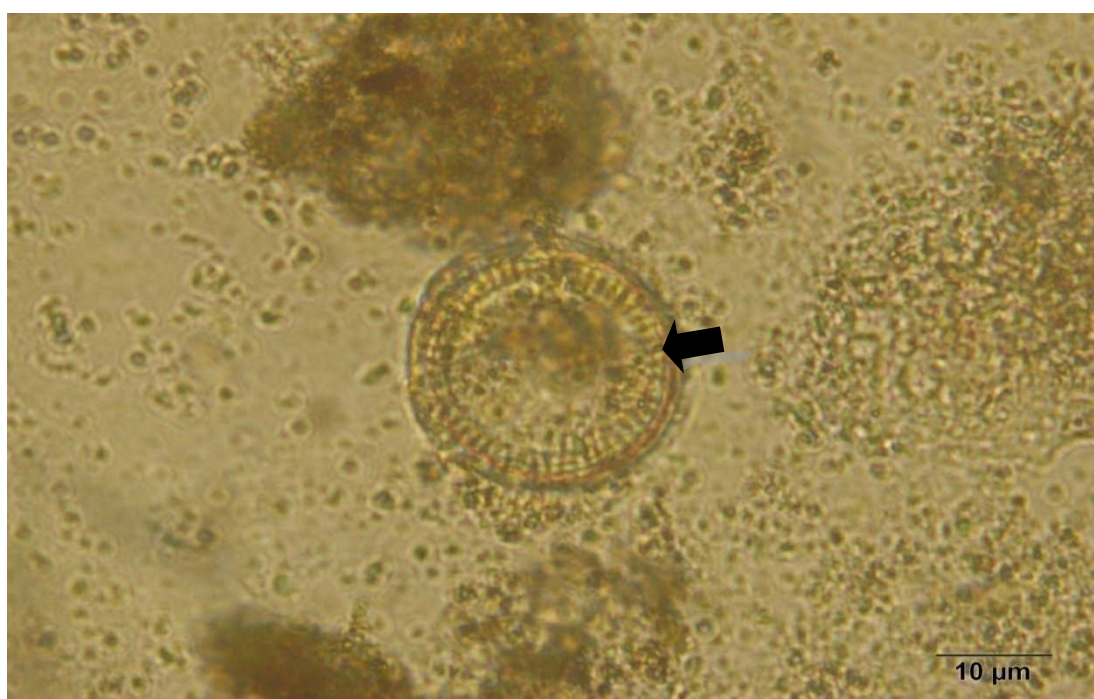


Figura 17. Presença de cílios (seta) no protozoário encontrado nas fezes. Técnica de impregnação por prata

No exame histopatológico, foram visualizados protozoários em todos os órgãos analisados, bem como presença de células inflamatórias. Também foi observada necrose de coagulação e caseificação de fígado, centros de melanomacrófagos, edema, degeneração vacuolar hepática e cerebral, hemorragia, granulomas e cistos parasitários,

presença de nematóides no fígado e intestino, colônias bacterianas, inclusão intranuclear e intracitoplasmática de linfócitos e hemácias (Figuras 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24). Tanto os peixes de cultivo quanto de pesca apresentaram as mesmas alterações microscópicas. Vale ressaltar que devido à morfologia dos protozoários visualizados em microscopia óptica comum sugerirem pertencer ao filo Apicomplexa, foram coletadas amostras de cérebro para visualizar a existência de lesões e a presença do parasita. Os cortes histológicos demonstraram encefalite (Figura 25), demonstrando que este agente é altamente patogênico para o animal, pois foi observado em todos os tecidos analisados causando diversas lesões. Vale ressaltar que os protozoários já descritos na literatura que acometem peixes têm predileção por um ou mais órgãos, normalmente não atingindo todos os tecidos.

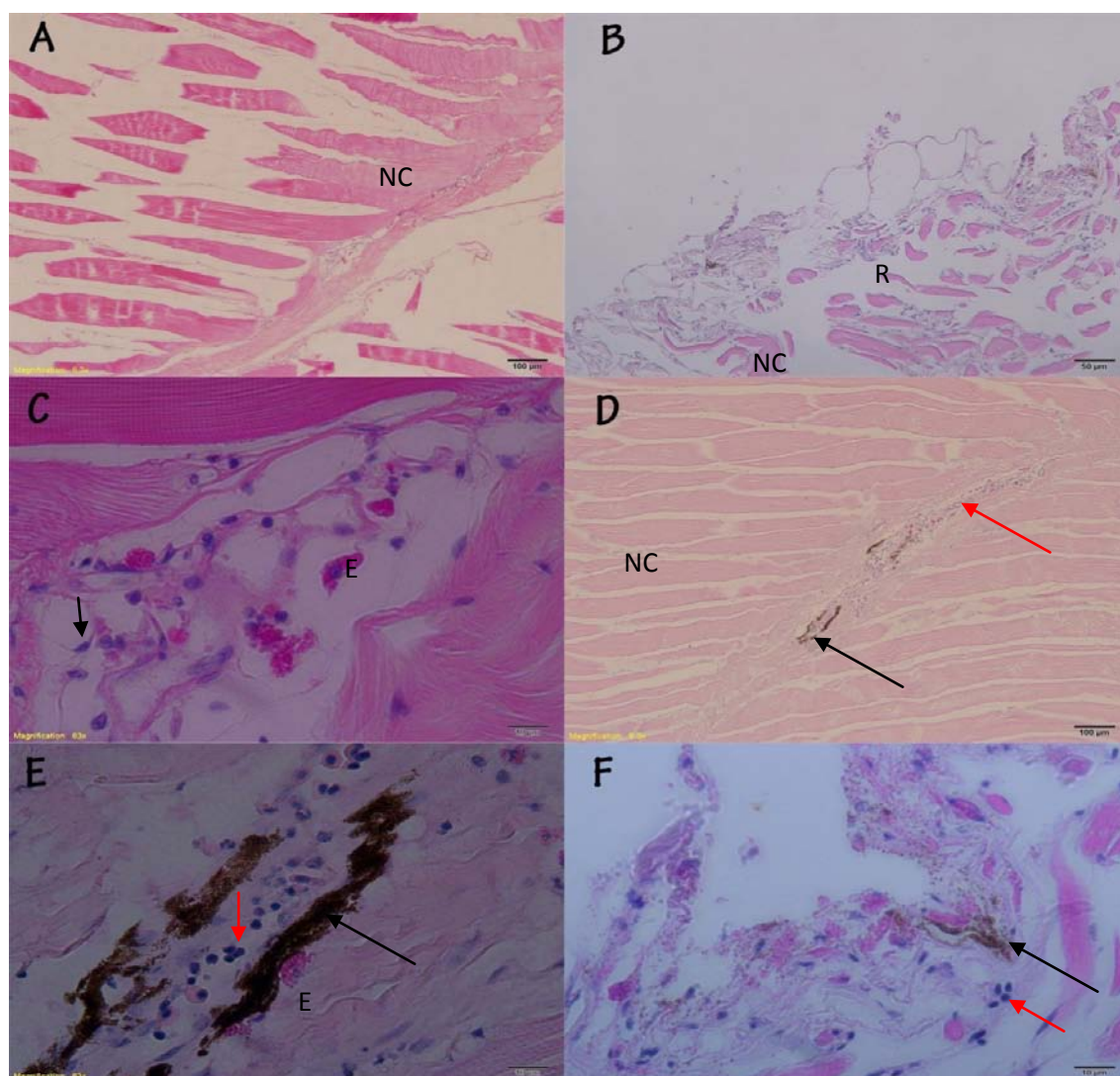


Figura 18. Corte histológico de tecido muscular (HE). A: necrose de coagulação (NC). B: necrose de coagulação (NC) e rarefação (R). C: presença de protozoários (seta) e

eosinófilos (E). D: necrose de coagulação (NC), colônia bacteriana (seta preta) e presença de protozoários (seta vermelha). E: presença de protozoários (seta vermelha), eosinófilos (E) e colônia bacteriana (seta preta). F: presença de protozoários (seta vermelha) e colônia bacteriana (seta preta)

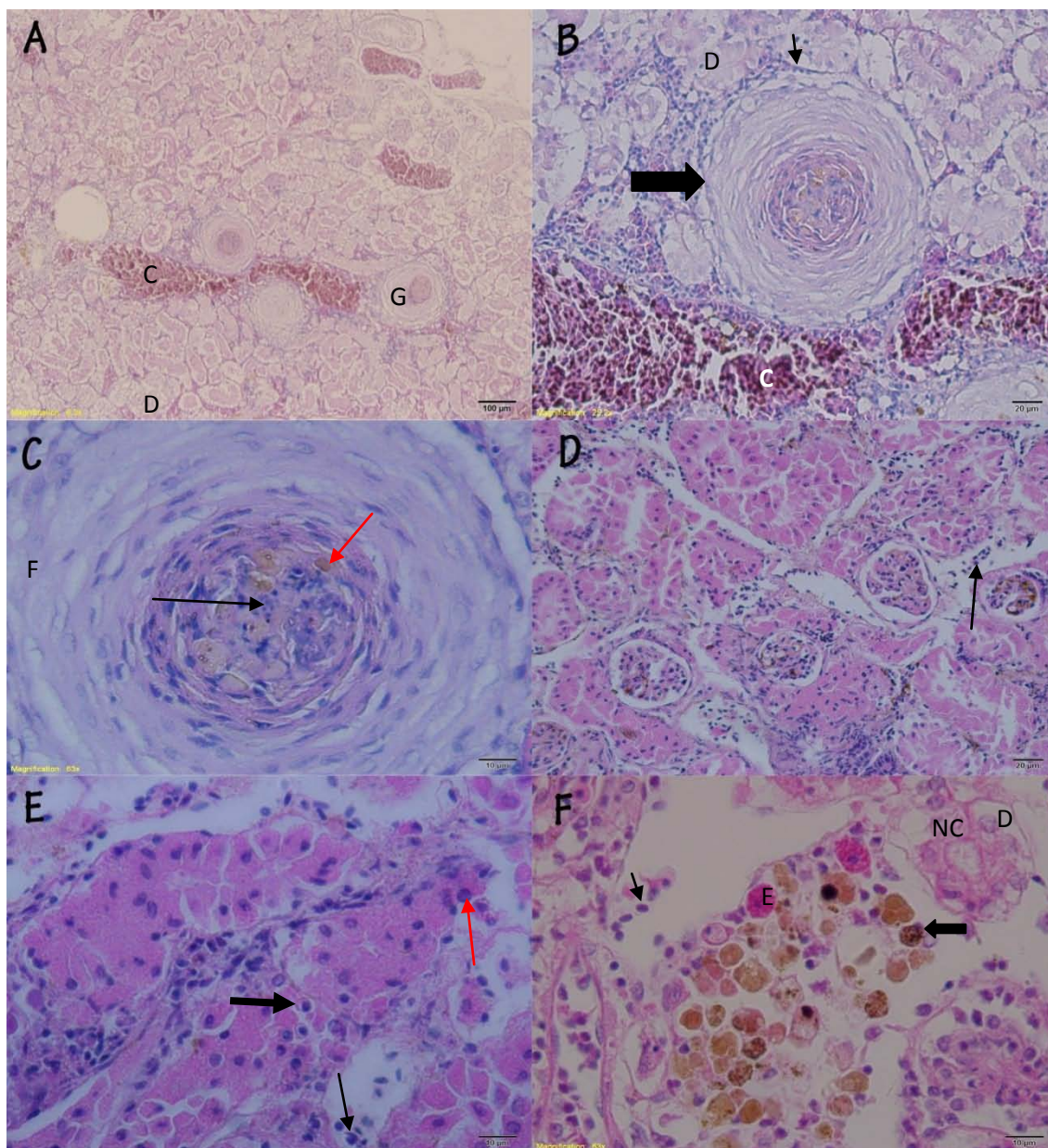


Figura 19. Corte histológico de tecido renal (HE). A: degeneração de túbulos renais (D), congestão (C) e granulomas (G). B: congestão (C), granuloma parasitário com fibrose (seta larga), degeneração de túbulos renais (D) e protozoários (seta fina). C: granuloma com fibrose (F), protozoários (seta preta) e melanomacrófagos (seta vermelha). D: presença de protozoários (seta). E: presença de protozoários (seta fina preta), inclusão intranuclear em linfócitos (seta grossa) e infiltrado inflamatório

mononuclear (seta fina vermelha). F: necrose de coagulação (NC), degeneração (D), presença de protozoários (seta), eosinófilos (E) e melanomacrófagos (seta larga)

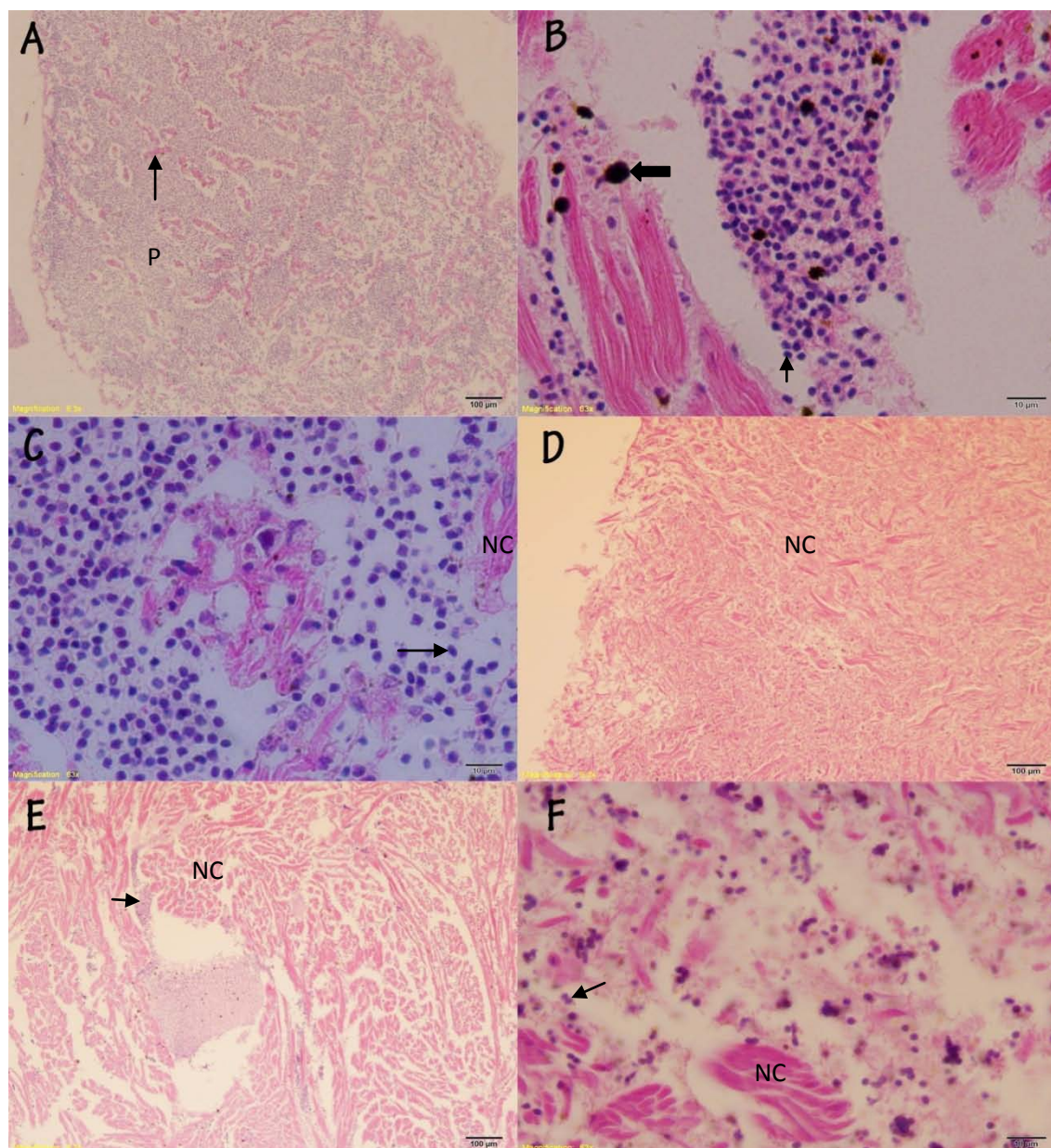


Figura 20. Corte histológico de tecido cardíaco (HE). A: necrose de coagulação (seta) e presença de protozoários (P). B: presença de protozoários (seta fina) e colônia bacteriana (seta larga). C: necrose de coagulação (NC) e presença de protozoários (seta). D: necrose de coagulação (NC). E, F: necrose de coagulação (NC) e presença de protozoários (seta)

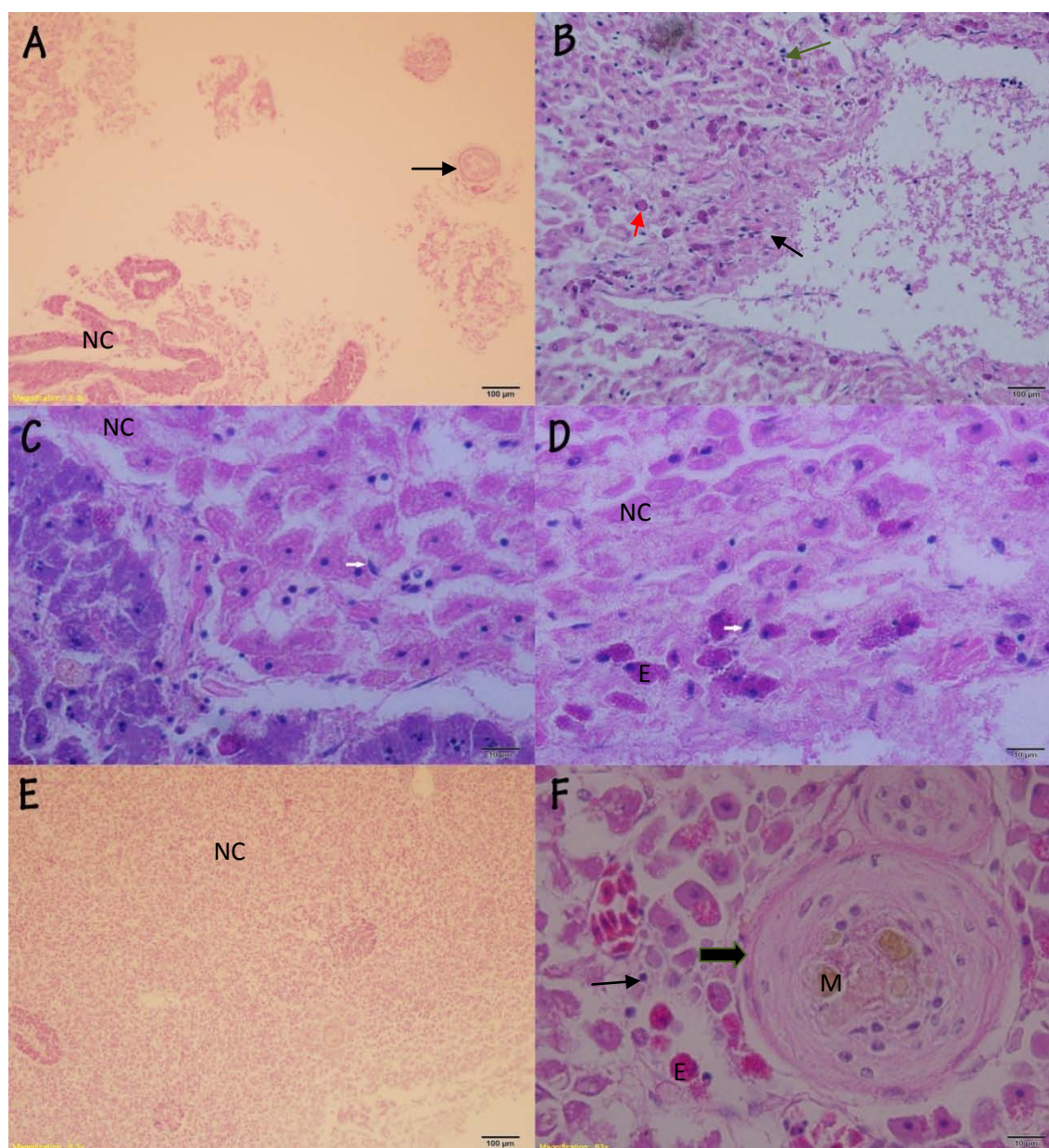


Figura 21. Corte histológico de tecido hepático (HE). A: necrose de coagulação (NC) e presença de nematóide (seta). B: degeneração vacuolar (seta preta), presença de eosinófilos (seta vermelha) e protozoários (seta verde). C: necrose de coagulação (NC) e presença de protozoários (seta). D: necrose de coagulação difusa (NC), presença de protozoários (seta) e eosinófilos (E). E: necrose de coagulação (NC). F: granuloma parasitário com fibrose (seta larga), melanomacrófagos (M) e protozoários (seta fina), e presença de eosinófilos (E)

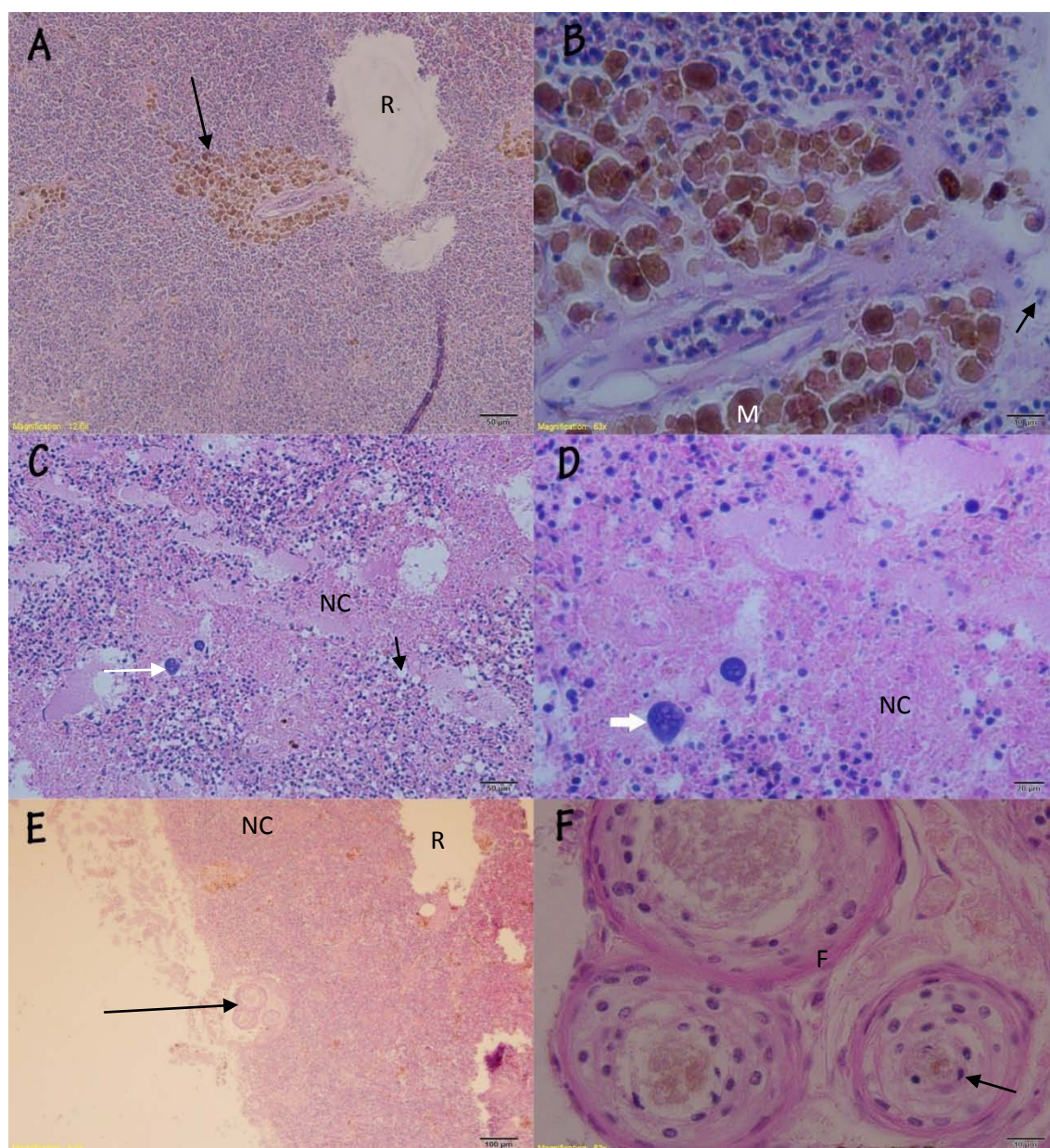


Figura 22. Corte histológico de tecido esplênico (HE). A: presença de melanomacrófagos (seta) e rarefação (R). B: presença de melanomacrófagos (M) e protozoários (seta). C: necrose de coagulação (NC), vacuolização (seta preta) e cistos parasitários (seta branca). D: necrose de coagulação (NC) e cistos parasitários (seta). E: necrose de coagulação (NC), rarefação (R) e granuloma parasitário (seta). F: granuloma parasitário com fibrose (F) e protozoários (seta)

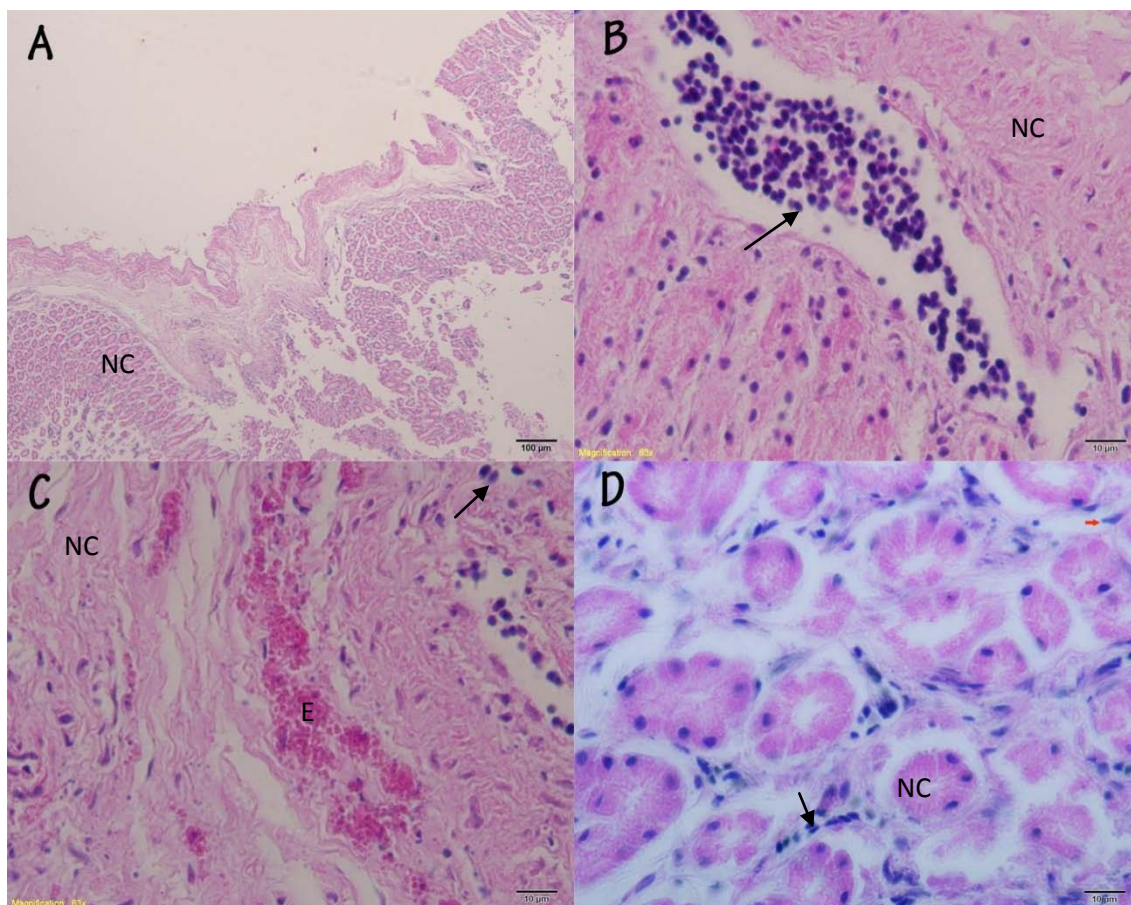


Figura 23. Corte histológico de tecido gástrico (HE). A: necrose de coagulação (NC). B: necrose de coagulação (NC) e presença de protozoários (seta). C: necrose de coagulação (NC), presença de eosinófilos (E) e protozoários (seta). D: necrose de coagulação (NC) e presença de protozoários (seta)

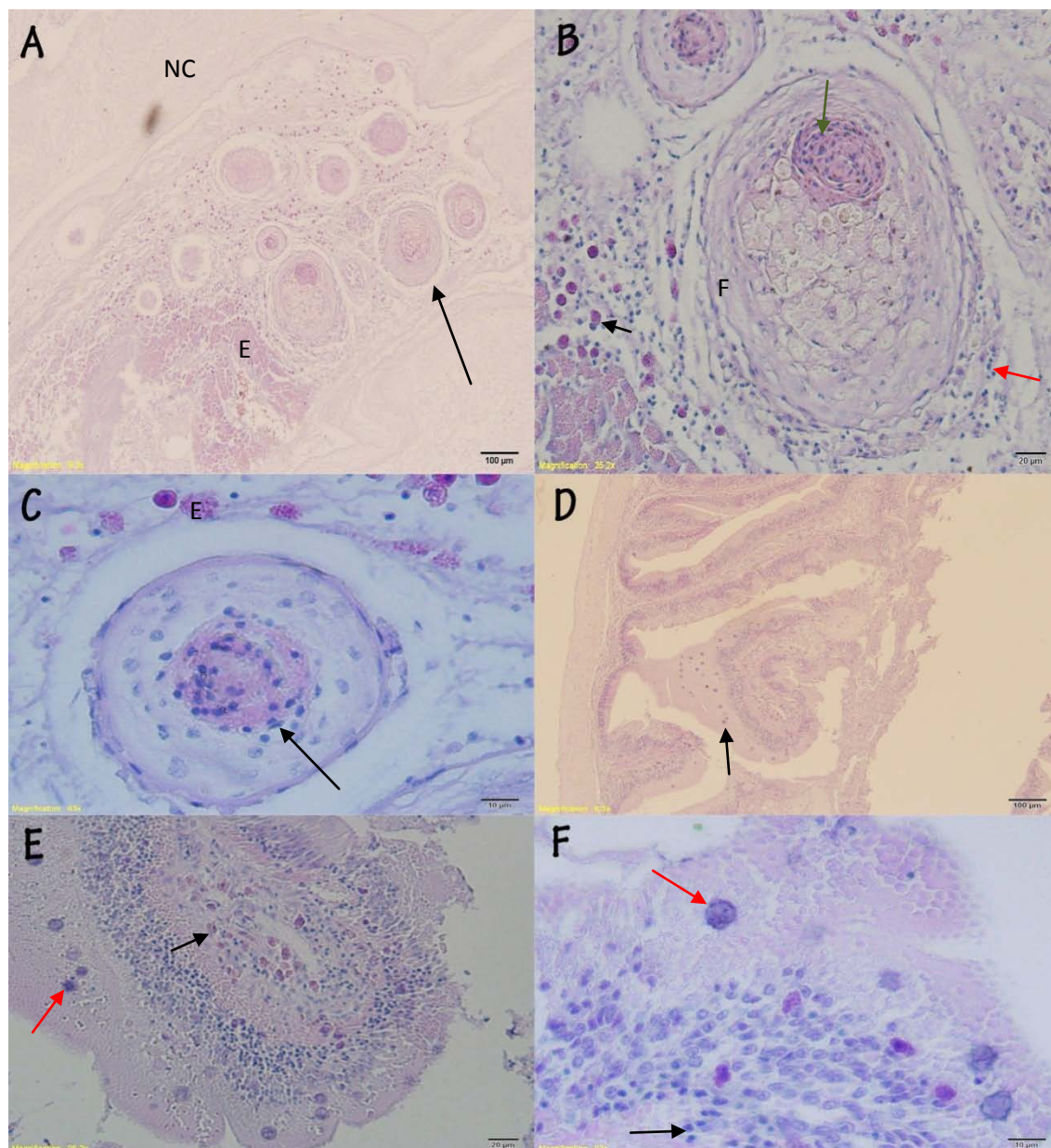


Figura 24. Corte histológico de tecido entérico (HE). A: necrose de coagulação (NC), presença de eosinófilos (E) e granulomas parasitários (seta). B: presença de eosinófilos (seta preta), protozoários (seta vermelha) e granuloma parasitário com fibrose (F) e protozoários (seta verde). C: presença de eosinófilos (E) e granuloma parasitário com protozoários (seta). D: presença de estruturas basofílicas sugestivas de esquizontes (seta). E: presença de eosinófilos, protozoários (seta preta) e estruturas basofílicas sugestivas de esquizontes (seta vermelha). F: presença de protozoários (seta preta) e estruturas basofílicas sugestivas de esquizontes (seta vermelha)

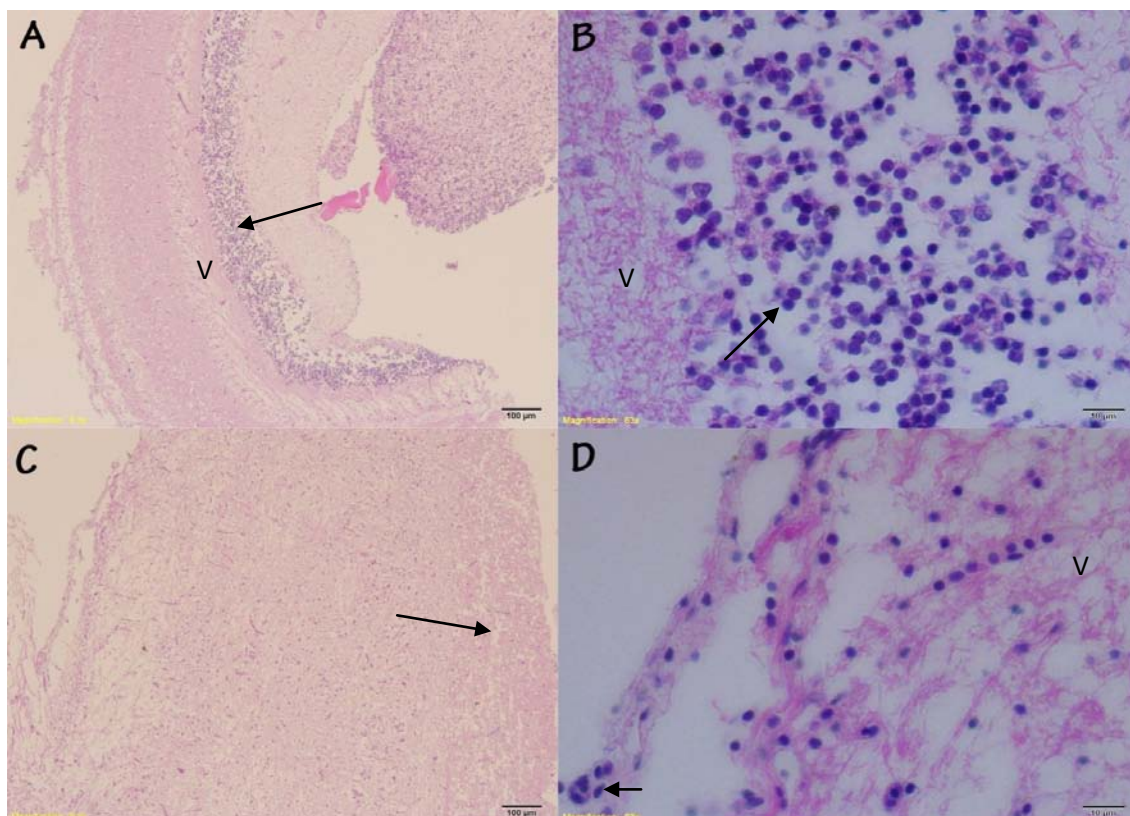


Figura 25. Corte histológico de tecido cerebral (HE). A, B: vacuolização (V) e infiltrado inflamatório mononuclear na camada granulosa (seta). C: vacuolização (seta). D: vacuolização (V) e presença de protozoários (seta)

Existem poucos trabalhos descrevendo alterações histopatológicas por protozoários em peixes, porém os achados são semelhantes para a maioria deles. Segundo Paperna (1991), Bruno et al. (2006), El Mansy (2008), Eli et al. (2012) e Pádua et al. (2013) em processos parasitários por protozoários pode ser observada lesões ulcerativas, descamassão, hemorragia, congestão, degeneração, hiperplasia, metaplasia, necrose, infiltrado inflamatório, presença de centros melanomacrófagos, edema, presença de cistos parasitários, formação de granulomas, lesões nodulares com cápsula fibrosa, alterações também observadas no presente estudo. Essas alterações podem ser em decorrência da reação inflamatória do hospedeiro frente ao agente ou devido à agressão pelo protozoário no hospedeiro (lesão endotelial, mucosa, serosa ou ainda em nível muscular). Bruno et al. (2006) e Eli et al. (2012) ainda relatam que os granulomas (também visualizados no presente estudo) são normalmente ocasionados por *Cryptobia iubilans* (acomete diversas espécies de peixes), *Spironucleus salmonis* (causa doença em salmão), *Balantidium* (ectoparasitos ciliados que afetam diversas espécies de peixes), *Sphaerospora*, *Plasmodia* e *Henneguya* que acometem diversas

espécies de peixes. No entanto, esses parasitos possuem tamanhos e morfologias diferentes do protozoário encontrado.

Devido à morfologia do protozoário observada no exame histopatológico (muitos apresentavam formato semelhante à “banana”), a visualização do local de infecção, principalmente músculo esquelético e cérebro, e estruturas sugestivas de esquizontes, comuns aos protozoários pertencentes à família Sarcocystidae foram adquiridos iniciadores, a fim de se identificar pelas técnicas moleculares (PCR, sequenciamento e análise filogenética) esse parasito.

Foi observado um protozoário invadindo a célula renal (Figura 26) e após 30 dias todas as células morreram, demonstrando provavelmente a alta patogenicidade deste agente. Esse achado é muito interessante, tendo em vista que no exame histopatológico o tecido renal sempre se apresentava necrosado e com intensa degeneração. O mesmo material foi submetido a PCR, amplificando o mesmo produto que dos demais tecidos analisados por esta técnica, sugerindo que o parasito observado é o causador da doença nos peixes analisados.

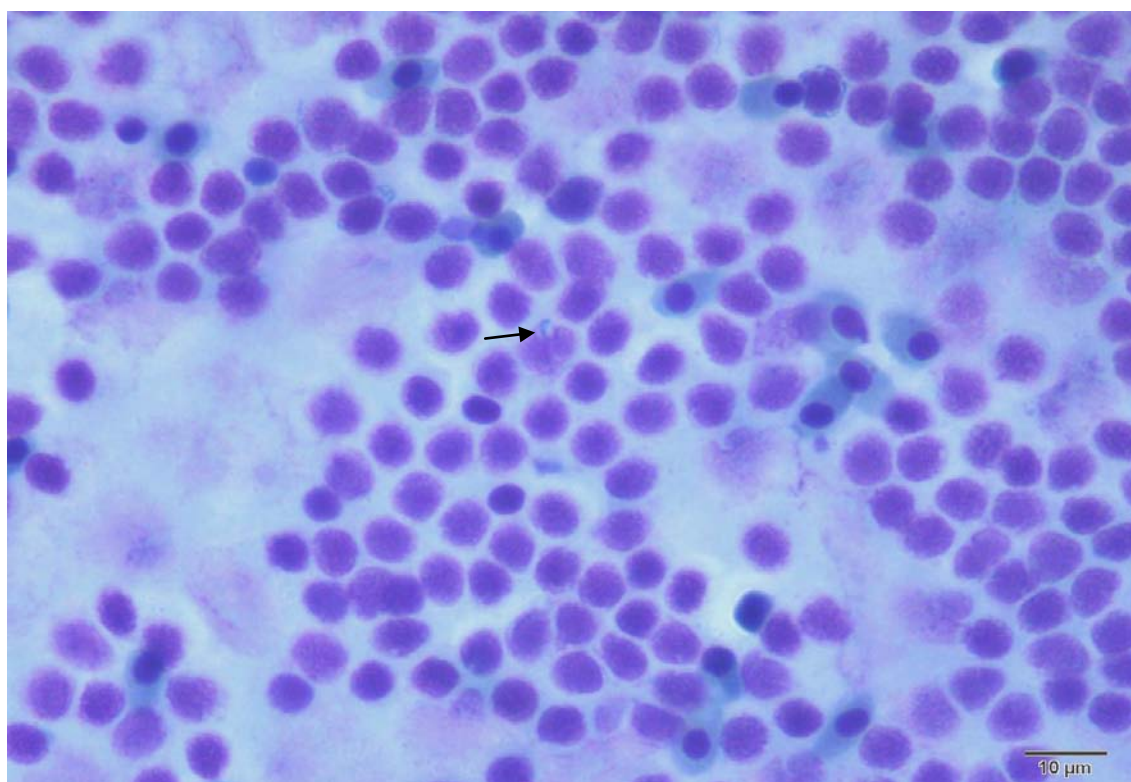


Figura 26. Cultivo celular primário de rim de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), apresentando protozoário (seta) invadindo a célula renal. Coloração de Giemsa

Nas amostras de sangue, coração e músculo foi possível observar apenas a presença de núcleo e grânulos densos (Figura 27), dificultando a identificação do agente. No entanto, nas amostras de cultivo celular observou-se que o parasito possui estruturas sugestivas de macro e micronúcleo (Figura 28), estruturas observadas em protozoários ciliados. No entanto, algumas estruturas ainda são desconhecidas (Figura 29), talvez devido ao surgimento de uma nova espécie de protozoário ou diferente estágio ainda não descrito na literatura. Embora não tenham sido observados cílios, o processamento da amostra para visualização pode ter perdido ou o estágio em que o parasito se encontra não apresenta essas estruturas. Para verificar se havia oocistos ou cistos nas fezes também se avaliou esse material, observando um cisto globular com parede fina (Figura 30) semelhante ao produzido pelo ciliado *Telotrochidium matiense* descrito por Martín-Cereceda et al. (2007).



Figura 27. Presença de protozoário em músculo esquelético. Observa-se núcleo (N) e grânulos densos (seta)

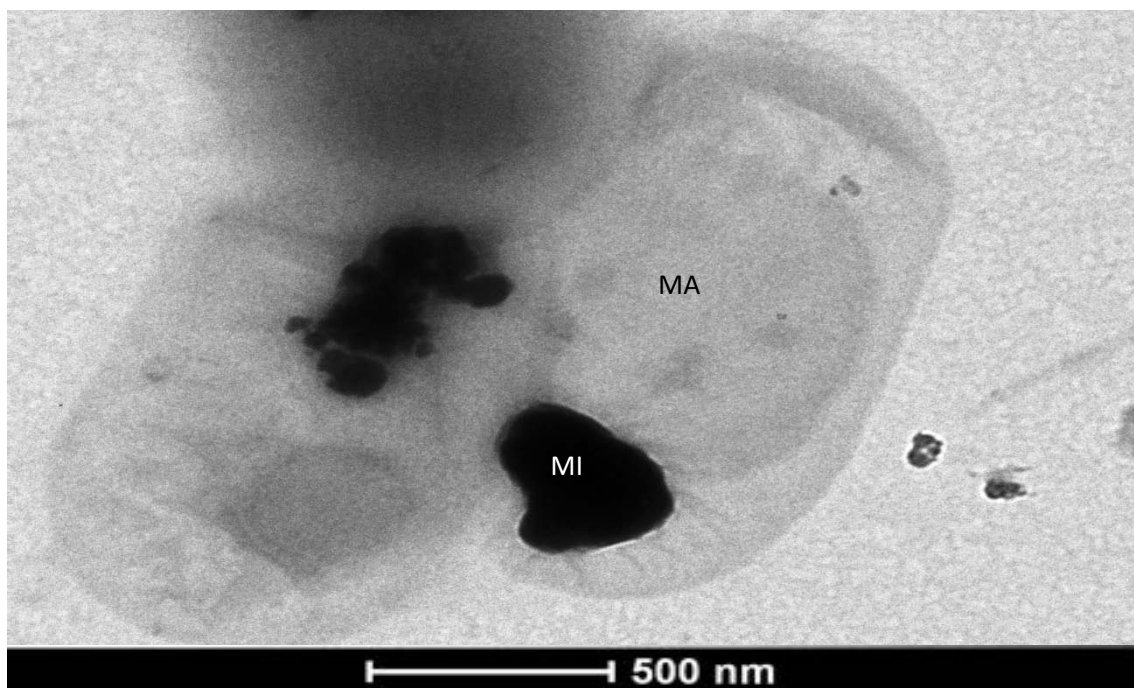


Figura 28. Presença de macronúcleo (MA) e micronúcleo (MI) em protozoário coletado do cultivo celular primário de rim de tilápia do Nilo

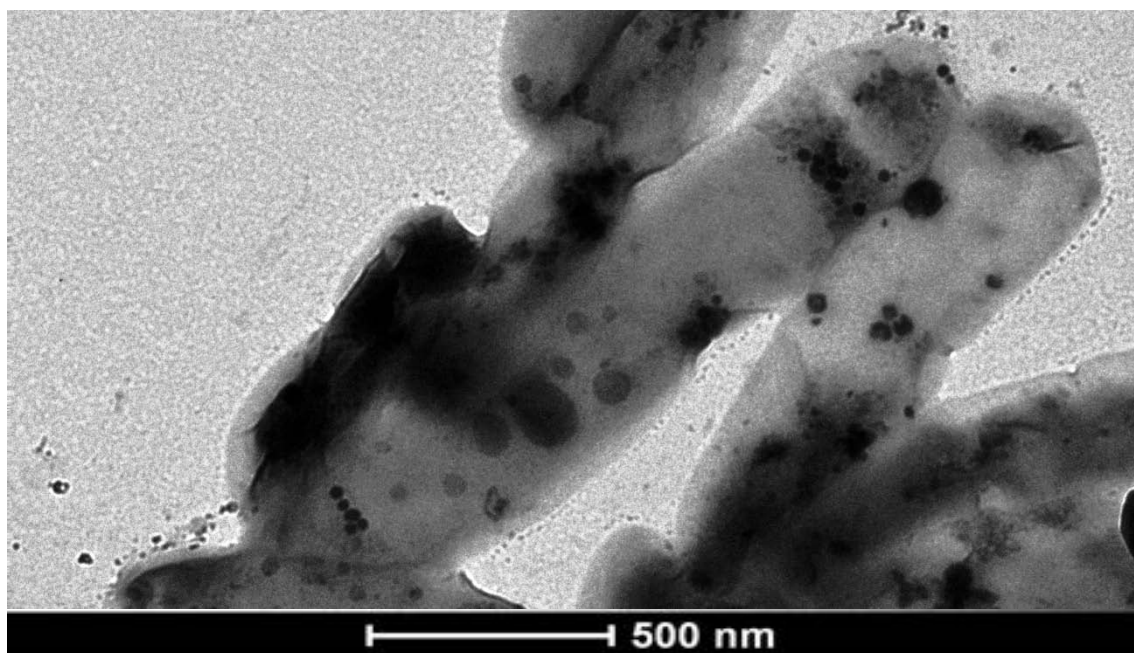


Figura 29. Presença de protozoários em amostra de cultivo celular primário de rim de tilápia do Nilo. Estruturas não identificadas

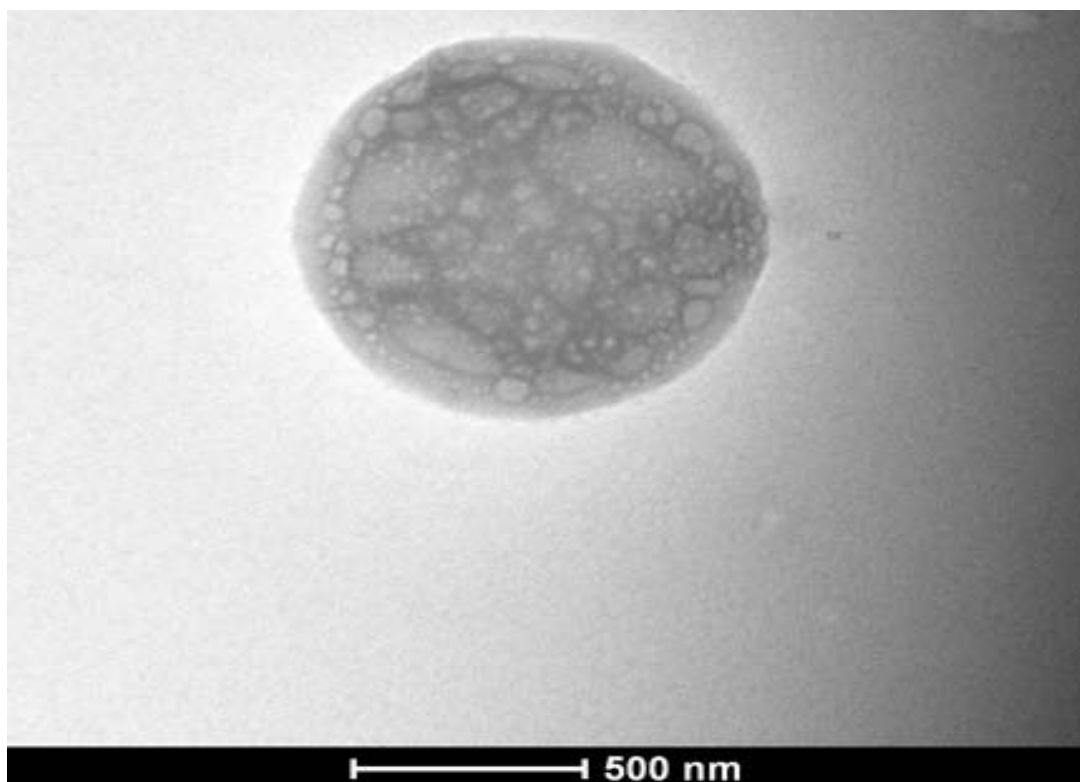


Figura 30. Presença de cisto globular com parede fina

De acordo com os regulamentos europeus (EC 91/67, EC 93/53, EC 94/306 e EC 96/240), os países pertencentes ao continente europeu e os que exportam produtos para esses países, devem controlar o status sanitário dos peixes pelos testes de diagnóstico: identificação em meios de cultura, sorologia, histologia e técnicas moleculares. No entanto, a legislação informa que as técnicas moleculares podem substituir os outros testes, pois também é uma ferramenta epidemiológica (pode diferenciar espécies e cepas). Além disso, a identificação morfológica em alguns casos pode ser muito difícil, dificultando o diagnóstico. Vale ressaltar que o Brasil ainda não possui essa exigência na legislação vigente, sendo apenas preconizado que se a infestação parasitária for maciça, o pescado deve ser condenado (BRASIL, 1997).

Frente ao exposto, o estudo utilizou a PCR convencional seguida de sequenciamento e análise filogenética para auxiliar na identificação e caracterização do protozoário observado na histologia e microscopia eletrônica de transmissão.

A PCR realizada com os iniciadores SFC-340f e SFC-1260r que reconhecem a região SSU rRNA de protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa amplificou um produto de 700 pb dos órgãos submetidos a esse teste de todos os peixes analisados

(aquicultura e pesca), sugerindo que o agente encontrado pertença a este filo. Os iniciadores não aplicaram os controles negativos (músculo de tilápia negativa adquirida de um supermercado e água livre de ácidos nucleicos). Após o alinhamento, avaliação da qualidade e exclusão dos iniciadores foi obtido um *contig* de 435 pb. No entanto, a sequência obtida apresentou alta similaridade com 98% de identidade (428/435) com o protozoário ciliado *Telotrochidium matiense* pertencente ao filo Ciliophora e família Opisthionectidae, pelo BLAST. Entretanto, a sequência que obtivemos no presente trabalho foi relativamente pequena para afirmar que o agente que está causando doença nos peixes seja esse ciliado. No entanto, a suspeita que o protozoário encontrado nas tilápias deste estudo pertença ao filo Apicomplexa é incorreta baseada nos achados morfológicos (histopatologia e exame de fezes) e resultados da PCR. Dessa forma, a análise da sequência obtida demonstrou que mesmo com experiência na área de parasitologia, as ferramentas usadas na rotina de um parasitologista (morfologia) deve ser revista, uma vez que a identificação correta foi possível apenas pelo sequenciamento.

Para verificar se realmente foi amplificado o DNA do agente, foi feita a PCR em tempo real com os iniciadores internos desenhados para este fim, o qual amplificou corretamente o produto determinado (106 pb), sem amplificação do controle negativo (água livre de ácidos nucleicos). Quando a amostra foi submetida ao sequenciamento, o resultado demonstrou que a amplificação foi da região da primeira sequência obtida.

A análise filogenética (Figura 31) demonstrou que a sequência obtida possui um ancestral comum com a espécie *T. matiense*, o que sugere que possa ser a mesma espécie, do mesmo gênero ou da mesma família que este ciliado. Esse pode ser o primeiro relato desse protozoário causando doença em peixes, tendo em vista que até o momento só existe ocorrência em bioreator e lodo. No entanto, são necessários diversos estudos para se estabelecer o ciclo biológico, patogenia e epidemiologia deste agente em animais aquáticos, a fim de se estabelecer medidas de controle e prevenção para impedir queda na produção e mortalidade dos animais, bem como evitar a disseminação deste agente.

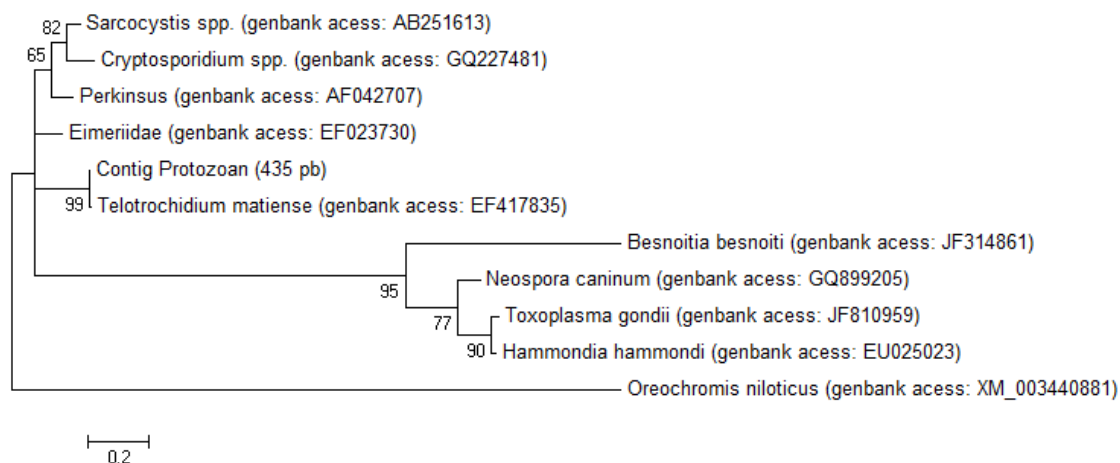


Figura 31. Árvore filogenética usando o modelo T92, com 500 repetições *bootstrap* e inferência bayesiana. Observa-se que a sequência obtida no presente estudo (Contig protozoan) apresenta um ancestral comum com *Telotrochidium matiense*

6. COMENTÁRIOS

Devido à alta prevalência de parasitismo e sua patogenicidade em tilápias foi feito um ofício (processo: SFA-SP 21052.011750/2013-02) com os resultados obtidos e o artigo elaborado para publicação foram encaminhados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para comunicar a ocorrência desse novo agente em peixes.

Embora ainda não se tenha estudado o ciclo biológico deste parasito, existe a possibilidade de afetar outras espécies de peixes e ter impacto em Saúde Pública, uma vez que existe o crescente hábito de consumir filé de tilápia cru. Outro agravante é que esses protozoários apenas foram detectados pela microscopia e a rotina de inspeção de pescado é feita pela análise sensorial. Dessa forma, seria interessante incluir amostragem para análise laboratorial dos peixes destinados ao consumo humano para pesquisa de protozoários, a fim de salvaguardar a saúde do consumidor.

7. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos podemos concluir que:

- As técnicas: *imprint*, esfregaço sanguíneo, exame de fezes e histopatologia auxiliaram na detecção e observação das lesões.
- A observação de estruturas internas pela microscopia eletrônica de transmissão foi possível apenas para as amostras de fezes e de cultivo celular primário de rim.
- Com uso das técnicas moleculares foi amplificado um produto de 435 pb da região SSU rDNA de protozoários com alta similaridade com a espécie *Telotrochidium matiense*, sugerindo ser o agente etiológico da doença nas tilápias analisadas.
- Os iniciadores internos reconheceram apenas DNA dos protozoários.

8. ESTUDOS FUTUROS /SUGESTÕES

Em decorrência da primeira descrição de *Telotrochidium matiense* em tilápias são necessários estudos posteriores para estabelecer o ciclo biológico, patogenicidade, identificar se há potencial zoonótico e avaliar o perfil epidemiológico. Para tanto, será realizado um estudo para sequenciar o genoma completo do protozoário, tendo em vista que os dados disponíveis são poucos. Também será feito bioensaio em camundongo e peixes para avaliar a patogenicidade com auxílio de achados de necropsia e histopatologia.

9. BIBLIOGRAFIA

ATTIAS, M. Desidratação, ultramicrotomia e contrastação. In: CAMPOS, A.P.C.; HADDAD, A.; SESSO, A.; MADARIM-DE-LACERDA, C.A.; MINGUES, F.C.; WEISSMULLER, G.; ROCHA, G.M.; WERCKMANN, J.; MIRANDA, K.; MEDEIROS, L.C.S.; ATTIAS, M.; FARINA, M.; MOTTA, M.C.; MEIRELLES, M.N.; SILVEIRA, M.; BENCHIMOL, M.; MONÇORES, M.C.; SOARES, M.J.; PEREIRA, M.C.S.; BARTH, O.M.; CORTE-REAL, S.; ZORN, T.M.T.; SOUTO-PADRÓN, T.; LINS, U.C.; SOUZA, W. *Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Wanderley Souza, 2007. p. 37-50.

BAILEY, R.G. Guide to the fishes of the River Nile in the Republic of the Sudan. *Journal of Natural History*, v. 28, p. 937-970, 1994.

BANU, A.N.H.; KHAN, M.H. Water quality, stocking and parasites of freshwater fish in four selected areas of Bangladesh. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 7, p. 436-440, 2004.

BARNABÉ, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology*, v. 120, p. 513-526, 2000.

BECK, H.P.; BLAKE, D.; DARDÉ, M.L.; FELGER, I.; PEDRAZA-DÍAZ, S.; REGIDOR-CERRILLO, J.; GÓMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L.M.; PUTIGNANI, L.; SHIELS, B.; TAIT, A.; WEIR, W. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *International Journal for Parasitology*, v. 39, p. 175-189, 2009.

BOUZID, M.; STEVERDING, D.; TYLER, K.M. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, p. 1-5, 2008.

BOWDEN, T.J.; THOMPSON, K.D.; MORGAN, A.L.; GRATACAP, R.M.L.; NIKOSKELAINEN, S. Seasonal variation and the immune response: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 22, p. 695-706, 2007.

BRAKE, D. Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. *International Journal for Parasitology*, v. 32, p. 509-515, 2002.

BRASIL. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Lei 1283 de 18/12/1950, regulamentada pelo decreto 30691 de 20/03/1952 e alterado pelo decreto 1255 de 25/06/1962. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1997. 154p.

BRASIL. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura*. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2012. 129p.

BREDER, C.M.; ROSEN, D.E. *Modes of reproduction in fishes*. Neptune City: T.F.H. Publications, 1966. 941p.

BRUNO, D.W.; NOWAK, B. ELLIOTT, D.G. Guide to the identification of fish protozoan and metazoan parasites in stained tissue sections. *Diseases of aquatic organisms*, v. 70, p. 1-6, 2006.

BRUSCA, R.C.; BRUSCA, G.J. Os protistas. In: _____ *Invertebrados*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 149-151.

COLDEBELLA, I. J.; BESOLD, C.; NITZ, L. F. Reprodução e criação da tilápia-donilo. In: BARCELLOS, L. J. G.; FAGUNDES, M. (Eds.). *Policultivo de jundiás, tilapias e carpas, uma alternativa de produção para a piscicultura rio-grandense*. 2. ed. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2012. p. 180-196.

CORLISS, J.O. Protozoan taxonomy and systematics. *Encyclopedia of Life Sciences*, p. 1-7, 2001.

CURRY, A. Electron microscopy and the investigation of new infectious diseases. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 7, n. 4, p. 251-258, 2003.

DEMIREV, P.A.; FELDMAN, A.B.; LIN, J.S. Bioinformatics-based strategies for rapid microorganism identification by mass spectrometry. *Johns Hopkins Applied Technical Digest*, v. 25, p. 27-37, 2004.

EC. Concerning the animal health conditions governing the placing o the market of aquaculture animals and products. Council directive. *Official Journal of the European Communities*, n. 67, p. 1-18, 1991.

EC. Introducing minimum community measures for the control of certain fish diseases. Council directive. *Official Journal of the European Communities*, n. 53, p. 23-33, 1993.

EC. Laying down the sampling plans and diagnostic methods for the direction and confirmation of certain mollusc diseases. Commission decision. *Official Journal of the European Communities*, n. 306, p. 51-53, 1994.

EC. Treaty to certain categories of technology transfer agreements. Commision Regulation. *Official Journal of the European Communities*, n. 240, p. 2-13, 1996.

EIRAS, J.C.; RANZANI-PAIVA, M.J.I.; DAVIES, A.J. Observations on *Haemogregarina mugili* (Apicomplexa) and *Trypanosoma froesi* (Sarcomastigophora) from the blood of *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Pisces: Mugilidae) in Brazil. *Research and Reviews in Parasitology*, v. 55, n. 3, p. 173-176, 1995.

ELI, A.; BRIYAI, O.F.; ABOWEI, J.F.N. A review of some parasite diseases of African fish gut lumen Protozoa, coccidiosis, *Cryptosporidium* infections, Haemoprotozoa, Haemosporidia. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*, v. 4, n. 11, p. 1438-1447, 2012.

EL-MANSY, A. New exogenous stages of oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Goussia cichlidarum* Landsberg and Paperna 1985 (Sporozoa: Coccidia) and impact of endogenous stages on the swim bladder of tilapias in Egypt. *Parasitology Research*, v. 102, p. 233-241, 2008.

Food and Agriculture Organization. *Cultured Aquatic Species Information Programme: Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). 2012a. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en>. Acesso em: 24 dez. 2012.

Food and Agriculture Organization. *Species Fact Sheets: Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). 2012b. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/species/3217/en>>. Acesso em: 24 dez. 2012.

FARMER, J.N. *The protozoa: introduction to protozoology*. St. Louis: C. V. Mosby Co., 1980. p. 360.

FAUST, E.C.; D'ANTONI, J.S.; ODOM, V.; MILLER, M.J.; PERES, C.; SAWITZ, W.; THOMEN, L.F.; TOBIE, J.; WALKER, J.H. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 18, p. 169-183, 1938.

FERNÁNDEZ-GALIANO, D. The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa from sewage (and other) waters. *Water Research*, v. 28, n. 2, p. 495-496, 1994.

FISHBASE. *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758): Nile Tilapia. 2012. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/Oreochromis-niloticus+niloticus.html>>. Acesso em: 24 dez. 2012.

FRANCO, L. *Tilápia: criação tipo exportação*. 2006. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=23315>>. Acesso em: 25 dez. 2012.

GHIRALDELLI, L.; MARTINS, M.L.; JERÔNIMO, G.T.; YAMASHITA, M.M.; ADAMANTE, W.B. Ectoparasites communities from *Oreochromis niloticus* cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 1, n. 2, p. 181-190, 2006.

GHONEIM, N.H.; ABDEL-MOEIN, K.A.; SAEED, H. Fish as a possible reservoir for zoonotic *Giardia duodenalis* assemblages. *Parasitology Research*, v. 110, p. 2193-2196, 2012.

HOFFMANN, G. Ciliates of freshwater fishes. In: KREIER, S. (Eds.). *Parasitic Protozoa*. New York: Academic Press. Inc., 1978. v. 2, p. 583-632.

JUNQUEIRA, L.C.V.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540p.

KYRIAZAKIS, I.; TOLKAMP, B.J.; HUTCHINGS, M.R. Towards a functional explanation for the occurrence of anorexia during parasitic infections. *Animal Behavior*, v. 56, p. 265-274, 1998.

KRISTMUNDSSON, A.; HELGASON, S.; BAMBIR, S.H.; EYDAL, M.; FREEMAN, M.A. *Margolisiella islandica* sp. nov. (Apicomplexa: Eimeridae) infecting Iceland scallop *Chlamys islandica* (Müller, 1776) in Icelandic waters. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 108, p. 139-146, 2011.

KUPERMAN, B.I.; MATEY, V.E. Massive infestation by *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellida) of fish in a highly saline lake, Salton Sea, California, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 39, p. 65-73, 1999.

LANDSBERG, J.H.; PAPERNA, I. Ultrastructural study of *Cryptosporidium* sp. From the stomach of juvenile cichlid. *Disease of Aquatic Organisms*, v. 2, p. 13-20, 1986.

LANDSBERG, J.H.; PAPERNA, I. Intestinal infections by *Eimeria* (s. l.) *vanasi* n. sp. (Eimeriidae, Apicomplexa, Protozoa) in cichlid fish. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v. 62, p. 283-293, 1987.

LAY, J.O. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 20, p. 172-194, 2001.

LIZAMA, M.A.P.; TAKEMOTO, R.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; AYROZA, L.M.S.; PAVANELLI, G.C. Relação parasito-hospedeiro em peixes de piscicultura da região de Assis, estado de São Paulo. Brasil 1. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1957). *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 29, p. 223-231, 2007.

MACMILLAN, J.R. Biological factors impinging upon control of external protozoan fish parasites. *Annual Review of Fish Diseases*, v. 1, p. 119-131, 1991.

MARTÍN-CEREDA, M.; GUINEA, A.; BONACCORSO, E.; DYAL, P.; NOVARINO, G.; FOISSNER, W. Classification of the peritrich ciliate *Opisthonecta matiensis* (Martín-Cereda et al., 1999) as *Telotrochidium matiense* nov. comb., based on new observations and SSU rDNA phylogeny. *European Journal of Protistology*, v. 53, p. 265-279, 2007.

MARTINS, M.L.; GHIRALDELLI, L. *Trichodina magna* Van as and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured Nile tilapia in the state of Santa Catarina, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 1, p. 169-172, 2008.

MARTINS, M.L.; AZEVEDO, T.M.P.; GHIRALDELLI, L.; BERNARDI, N. Can the parasitic on Nile tilapia be affected by different production systems? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 82, p. 493-500, 2010.

MARTINS, M.L.; SHOEMAKER, C.A.; XU, D.H.; KLESIUS, P.H. Effect of parasitism on vaccine efficacy against *Streptococcus iniae* in Nile tilapia. *Aquaculture*, v. 314, p. 18–23, 2011.

MAXON, L.R.; MAXON, R.D. Proteins II: immunological techniques. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C. *Molecular Systematics*. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p. 127-155.

McMANUS, D.P.; BOWLES, J. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematic. *International Journal for Parasitology*, v. 26, n. 7, p. 687-704, 1996.

MOELLER JR., R.B. *Fish necropsy and biopsy procedures*. California: California Animal Health and Food Safety Laboratory System, 2012. Disponível em: <http://www.cichlid-forum.com/articles/fish_necropsy_biopsy.php>. Acesso em: 10 de outubro de 2012.

MONIS, P.T.; GIGLIO, S.; KEEGAN, A.R.; THOMPSON, R.C.A. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 7, p.340-346, 2005.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Favourable condition and principal teleostean diseases in intensive fish farming. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSE, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). *Especial topics in tropical intensive freshwater fish farming*. São Paulo: Tec Art, 2004. p. 343-383.

MORLEY, N.J. The effects of radioactive pollution on the dynamics of infectious diseases in wildlife. *Journal of Environmental Radioactivity*, v. 106, p. 81-97, 2012.

MORRISON, D.A. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends in Parasitol.*, v. 25, n. 8, p. 375-382, 2009.

NOGA, E.J. Protozoan ectoparasites: general features. In:_____ (Eds.) *Fish disease: diagnosis and treatment*. 2. ed. Sidney: Wiley-Blackwell, 2010. p. 129-131.

PÁDUA, S.B.; MARTINS, M.L.; CARRIJO-MAUAD, J.R.; ISHIKAWA, M.M.; JERÔNIMO, G.T.; DIAS-NETO, J.; PILARSKI, F. First Record of *Chilodonella hexasticha* (Ciliophora: Chilodonellidae) in Brazilian cultured fish: A morphological and pathological assessment. *Veterinary Parasitology*, v. 191, p. 154-160, 2013.

PANTOJA, W.M.F.; NEVES, L.R.; DIAS, M.R.D.; MARINHO, R.G.B.; MONTAGNER, D.; TAVARES-DIAS, M. Protozoan and metazoan parasites of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in Brazil. *Revista MVZ Córdoba*, v. 17, n. 1, p. 2812-2819, 2012.

PAPERNA, I. Diseases caused by parasites in the aquaculture of warm water fish. *Annual Review of Fish Diseases*, p. 155-194, 1991.

PHILIPPART, J.C.; RUWET, J.C. Ecology and distribution of tilapias. In: PULLIN, R. S. V.; LOWE-McCONNELL, R. H. (Eds.). *The biology and culture of tilapias*. Philippines: International Center for Living Aquatic Resources Management, 1982. p. 15-60. (ICLARM Conference Proceedings, 7).

PIEROBOM, J.L. *Estudo da sustentabilidade ambiental em diferentes sistemas de criação de tilápias*. 2009. 104f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Engenharia de Produção, Universidade Paulista, São Paulo, 2009.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Co-infection of gills by different parasite groups in the mullet, *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae): effects on relative condition factor. *Brazilian Journal of Biology*, v. 64, p. 677-682, 2004.

RAETHER, W.; HOFMANN, J.; UPHOFF, M. Cultivation and cryopreservation. In: ECKERT, J.; BRAUN, R.; SHIRLEY, M.W.; COUDERT, P. (Eds.), *Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 1995. p. 79–84.

RUDNICKI, C.A.M. Análise qualitativa e quantitativa das histopatologias causadas pelo organofosforado Azodrin®400 sobre o tecido branquial do peixe de água doce *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) após exposição subletal. 2004. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. Protozoa. In: ____ *Zoologia dos invertebrados*. 7. ed, São Paulo: Roca, 2005. p. 27-54.

SEBRAE. *Aquicultura e pesca: tilápias: estudos de mercado*. Brasília: SEBRAE/ESPM, 2008. 160p. (Relatório completo).

SAVIN, M.C.; MARTIN, J.L.; LEGRESLEY, M.; GIEWAT, M.; ROONEY-VARGA, J. Plankton diversity in the Bay of Fundy as measured by morphological and molecular methods. *Microbial ecology*, v. 48, p. 51-65, 2004.

SITJÁ-BIBADILLA, A. Living off a fish: a trade-off between and the immune system. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 25, p. 358-372, 2008.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, v. 98, p. 503-517, 1975.

SURESH, V. Tilapias. In: LUCAS, J.S.; SOUTHGATE, P.C. *Aquaculture: farming of aquatic animals and plants*. United Kingdom: Blackweel Publishing, 2003. p. 321-245.

SUSSEL, F.R. Tilapicultura no estado de São Paulo. *Pesquisa & Tecnologia*, v. 8, n. 2, p. 1-4, 2011.

TARDIEUX, L.; MENARD, R. Migration of Apicomplexa across biological barriers: the *Toxoplasma* and *Plasmodium* rides. *Traffic*, v. 9, p. 627-635, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Fauna parasitária de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. I. Protozoários. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 18, n. 1, p. 67-79, 2001.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. Taxonomia e morfologia parasitárias. In: _____. *Parasitologia veterinária*. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2010. p. 38-39.

THOMPSON, R.C.A. Molecular systematic and diagnosis. *Veterinary Parasitology*, v. 125, p. 69-75, 2004.

THOMSON, F.L.; de OLIVEIRA, V.M.; de AZEVEDO, J.L.; de ARAÚJO, W.L.; INÁCIO, C.A.; SELEGHIM, M.H.R.; KITAJIMA, E.W. *Taxonomia: microbiana, de procariontes, de fungos, de protozoários e de vírus*. Relatório. Brasília: CGEE, 2005. 53p.

Disponível

em:

<<http://www.cgee.org.br/busca/ConsultaProdutoNcomTopo.php?f=1&idProduto=1752>>
Acesso em: 09 jan. 2013.

TODRYK, S.M.; HILL, A.V. Malaria vaccines: the stage we are at. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p. 487-489, 2007.

TRAUB, R.J.; MONIS, P.T.; ROBERTSON, I.D. Molecular epidemiology: a multidisciplinary approach to understanding parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, v. 35, p. 1295-1307, 2005.

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

WAAL, T. Advances in diagnosis of protozoan diseases. *Veterinary Parasitology*, v. 189, p. 65-74, 2012.

Wettere, A.J.V. *Atxoplasmosis in Poultry (Isosporosis, Lankesterellosis)*. The Merck Veterinary Manual. 2012. Disponível em: <www.merckmanuals.com/vet/poultry/bloodborne_organisms/atxoplasmosis_in_poultry.html> Acesso em: 29 maio 2013.

WURMANN, C.G. *Regional review on status and trends in aquaculture development in Latin America and the Caribbean*. Roma: FAO Fisheries and Aquaculture, 2010. 212p. (Circular, n. 1061/03).

YAEGER, R.G. Protozoa: structure, classification, growth, and development. In: BARON, S. *Medical microbiology*. 4. ed. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1996. chap. 77, p. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8325/>>. Acesso em 29 dez. 2012.

ZAGO, A.C. *Análise parasitológica e microbiológica de tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus) criadas em tanques-rede no reservatório de Água Vermelha-SP e suas inter-relações com as variáveis limnológicas e fase de criação*. 2012. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.

10. TRABALHO CIENTÍFICO

10.1 Normas da revista: “Emerging Infectious Disease”

Manuscript Preparation and Submission

Editorial Policy

For information about editorial policy, visit <http://wwwnc.cdc.gov/eid/pages/editorial-policy.htm>

Word Processing

For word processing, use Microsoft Word. The font should be 12 pt. Times New Roman; the document should be double-spaced and left justified. Use 1 space rather than 2 spaces after a period. See the Typeface section for additional information.

Parts of a Manuscript

Each manuscript should contain each of the following elements, in the following order.

Title Page

Give complete information about each author (i.e., full name, graduate degree(s), affiliation, and the name of the institution in which the work was done. Clearly identify the corresponding author and provide that author’s mailing address (include phone number, fax number, and email address). Include separate word counts for abstract and text.

Article Summary Line

For perspectives, synopses, policy reviews, and research studies, include a clear, brief 1-sentence summary of the article’s conclusions; the summary will appear on the print table of contents. This sentence should highlight the bottom-line public health implications of the article and should be pithy, readable, and designed to entice someone to read the full article.

Running Title

A running title that will appear on the top of each right-hand print page and along top of the online browser window. The running title should be no more than 50 characters long, including spaces. Some common abbreviations (*E. coli*) and acronyms (MRSA, MDR TB, XDR TB) are allowed in running titles, but less familiar terms should be written out within the character limit.

Keywords

Include appropriate keywords (no limit); use terms listed in the National Library of Medicine Medical Subject Headings [index](http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html) (www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html). Do not use formatting (boldface or italics) in keywords (note that they are only used for indexing and are not visible to readers).

Title

The title should be brief, concise, and call attention to the main point of the article. With a few exceptions, abbreviations and acronyms must be written out in full in titles but numbers can be given as digits rather than spelled out. EID does not use subtitles in titles or titles that are sentences.

Authors

Give complete information about each author (i.e., full name, affiliation, and the name of the institution where the work was done). Provide, at minimum, first and last names of each author. Middle names or initials and academic degrees are optional, although academic degrees will not appear in the published article. (Note: use periods, but no spaces, between initials.)

Use the following format:

Dana C. Crawford, Shanta M. Zimmer, Craig A. Morin, Nancy E. Messonnier, Ruth Lynfield, Qian Yi, Cynthia Shephard, Michelle Wong, Mark J. Rieder, Robert J. Livingston, Deborah A. Nickerson, Cynthia G. Whitney, and Jairam Lingappa

If 2 or more authors contributed equally to an article, this contribution may be acknowledged with a footnote that states “These authors contributed equally to this

article.” However, a biographical sketch will be printed for only the first author (unless the article has only 2 authors).

Affiliations

Authors may list multiple affiliations, but provide only the overall institutional affiliation for each, not departments or other subunits. Identify city, state or province (for USA, Canada, Australia only), and country.

Incorrect: National Immunization Program, Coordinating Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

Correct: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

Incorrect: Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA

Correct: University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA

Author’s full initials and last name will appear after their respective institutions.

Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA (J. Doe, A.-E. Smith); and University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA (J. Doe, B. Jones)

Use heading of “Author affiliations:” (>1 affiliation) or “Author affiliation” (1 only). No possessive (i.e., not Authors’).

Drop redundant material after first mention, unless something changes after city.

Author affiliation: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA; Emory University, Atlanta

Author affiliations: University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts, USA; EviMed Research Group, LLC, Goshen, Massachusetts, USA

Author affiliations: Columbia University, New York, New York, USA; The Consortium for Conservation Medicine, New York; University of California,

Santa Cruz, California, USA; New York State Department of Health, Slingerlands, New York, USA

Author affiliations: Queensland Health, Brisbane, Queensland, Australia; University of Queensland, Brisbane; Auckland University of Technology, Auckland, New Zealand; OzFoodNet, Canberra, Australian Capital Territory, Australia; OzFoodNet, Wollongong, New South Wales, Australia; and Australian National University, Canberra

When all authors have 2 affiliations, and those affiliations are the same it is acceptable to format as:

Author affiliations: Grady Memorial Hospital, Atlanta, Georgia, USA; and Emory University, Atlanta.

Universities with multiple campuses:

Write campus (city) location as city, so it appears only once.

Incorrect: University of California, Los Angeles, Los Angeles, California, USA

Correct: University of California, Los Angeles, California, USA

Names of institutions (including geographic designations that are part of the name) need not be translated into English. However, the city, state or province, and country listed in the affiliation should be given as the common English preferred designation in the Getty Thesaurus of Geographic Names.

Incorrect: Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia

Correct: Università degli Studi di Firenze, Florence, Italy

Institut Pasteur (Pasteur Institute in English) should list the city separately, not as part of the name.

Incorrect: Institut Pasteur de Morocco, Casablanca, Morocco

Correct: Institut Pasteur, Casablanca, Morocco

Countries: Abbreviate USA and UK within affiliations in all cases. Include the state, territory, or province only for the USA, Canada, and Australia. Do not list the country for cities in England (only UK); do specify Wales, Scotland, or Northern Ireland for cities in these countries.

List China as China. For Taiwan, it is up to the author's discretion whether or not to use "Republic of China."

On second mention within affiliations, abbreviate DRC (Democratic Republic of the Congo)

List Hong Kong as Hong Kong, China, at first mention, then just Hong Kong at subsequent mention. Special Administrative Region is not the preferred usage, according to Getty.

Mention Singapore (city/country) only once.

According to Australia's postal conventions, the suburb, not the city, is used in an address.

Organizations in author list: If the author list on an article includes an organization and a membership list is given, follow this process:

1. Insert a superscript footnote number after the organization name.
2. Insert a footnote after the affiliations in this format: "Additional members of [group name] who contributed data are listed at the end of this article." If no members are listed separately as authors, delete "additional"; "who contributed data" can also be deleted if appropriate, such as when all group members are listed.
3. Place the member list directly after the text of the article, formatted using the Acknowledgments style. If there is an Acknowledgments header, then this paragraph should go before the header (not under it).
4. Use the same wording as the footnote as an introduction before the list: "Additional members of [group name] who contributed data:"

5. If locations are given, list name first, then location in parentheses. That is, “S.N. O’Connor (United States),” not “United States: S.N. O’Connor.”

Abstract

An abstract is a brief, comprehensive summary of the contents of the article; it allows readers to survey the contents of an article quickly, and like a title, it enables abstracting and information services to index and retrieve articles. An abstract should briefly summarize the research question and any relevant background information, methods, results, and conclusions. Avoid vague or promising phrases such as “...implications of these findings are discussed;” instead, state public health implications of the results.

Do not use structured abstracts (i.e., subheadings). Do not cite references in the abstract. Abstracts for perspectives, synopses, policy reviews, and research studies should not exceed 150 words. Abstracts for dispatches should not exceed 50 words. Letters, book reviews, and conference summaries do not have abstracts.

Text

Keep formatting simple. Use 12-point Times New Roman font with ragged right margins (left justified). Double space everything, including the title page, abstract, references, tables, and figure legends. Indent paragraphs; leave no extra space between paragraphs. After a period, leave only 1 space before beginning the next sentence. Italicize (rather than underline) scientific names when needed.

Acknowledgments

Full names only, not titles (e.g., Doctor, Professor) and affiliations, are listed for persons acknowledged. Acknowledgments for materials supplied belong as a parenthetical citation in the text where materials are mentioned.

Disclaimers

A disclaimer is placed on the inside front cover of the published journal and used periodically throughout the publication. It states, “The opinions expressed by authors contributing to this journal do not necessarily reflect the opinions of the Centers for Disease Control and Prevention or the institutions with which the authors are affiliated.” Additional disclaimers are discouraged.

Biographical Sketch

For all article types, excluding letters, media reviews, and conference summaries, include a short (2–3 sentences) biographical sketch of only the first author or of both authors if only 2 authors. Include current position and affiliations (city but not state and country if same as in author affiliation list) and primary research interests.

References

Follow Uniform Requirements [\[5\]](http://www.icmje.org/index.html) style (www.icmje.org/index.html). Do not use endnotes for references. Place reference numbers in parentheses (do not use superscript style), and italicize numbers. Number citations in order of appearance, including references in figures and tables. If a reference is used in a figure key or label or in a figure legend, it should be numbered in order with any reference numbers that have preceded the first figure citation in text. For example, if references 1–10 have been cited in text, and the figure contains a previously uncited reference, that reference should be numbered as 11 (and text reference citations renumbered accordingly).

Consult NLM Catalog [\[5\]](http://www.nlm.nih.gov/catalog/) for accepted journal abbreviations; if a journal is not listed, spell out the journal title in full. List the first 6 authors followed by “et al.” For juniors and subsequent sequels, include the designation (with no punctuation) after the first initial: “von Hoffman J Jr” or “Snowden CM III.” When there are >6 individual authors and a working group, list the first 6 authors, followed by et al., then the group.

Doe, Smith, Jones, Lane, Carter, James, et al.; The XYZ Working Group.

For organizations as author, spell out the full name of the organization (World Health Organization, not WHO) if it is the author, or just give the title with no author. Never use “Anonymous” or “No author given.”

For publisher location, place US states or country names in parentheses.

Adelaide (Australia): Adelaide University

Ames (IA): Iowa University Press

Cite personal communications and unpublished data (including manuscripts in preparation or submitted for publication but not yet accepted) in parentheses in text:

(D.E. Berg, pers. comm.)

(D. Stantio, unpub. data)

Articles in press (accepted for publication but not yet published) should include publication name and current year (no comma).

Authors. Article name. Publication name. In press 2008.

The following cities should be used without the state or country name when listed in references, meeting, or publisher locations (e.g., New York: John Wiley & Sons). Provide state or country name in text for manufacturer locations (e.g., Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)

Atlanta	Cincinnati	Madrid	Pittsburgh
Amsterdam	Cleveland	Mexico City	Prague
Baltimore	Copenhagen	Miami	Rome
Basel	Dallas	Milan	San Francisco
Beijing	Denver	Minneapolis	Seattle
Belgrade	Detroit	Montreal	St. Louis
Berlin	Dublin	Moscow	Stockholm
Bonn	Edinburgh	Munich	Tokyo
Boston	Frankfurt	Naples	Toronto
Brussels	Geneva	New Orleans	Turin
Budapest	Houston	New York	Uppsala

Buenos Aires	Kiev	Oslo	Vienna
Cairo	Leningrad	Oxford	Warsaw
Cambridge*	London	Paris	Washington
Chicago	Los Angeles	Philadelphia	Zurich

* Cambridge, Massachusetts, should be listed with the state.

Abstracts

Abstracts can be cited in the references. If the abstract has only a number, cite the name of the booklet (e.g., Program and Abstracts).

Galil K, Singleton R, Levine O, Fitzgerald M, Ajello G, Bulkow L, et al. High prevalence of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) carriage among Alaska Natives despite widespread use of Hib-conjugate vaccine. In: Abstracts of the 35th Infectious Diseases Society of America; San Francisco; 1997 Sep 13–16; Abstract 421. Alexandria (VA): Infectious Diseases Society of America; 1997.

Dissertations, Theses

Dissertations can be used as references; theses cannot. Cite theses in the text, giving all information that would normally be included in a reference. International variations in terminology occur; the primary distinction is whether or not the work is published.

Electronic Citations

If a URL is provided, it is not necessary to say “Available from.” The URL alone is sufficient. Do not give a URL for articles that have a Medline link. Include the date cited for each URL listed in references. Use the URL for the specific page where information can be found, not to the main page of the website.

Wikipedia information should be cited in text (see www.wikipedia.org/wiki/....), not as a numbered reference.

Below are some examples of references that may not be listed in Uniform Requirements.

Electronic Journal Citations

Ben Amor Y, Nemser B, Sing A, Sankin A, Schluger N. Underreported threat of multidrug-resistant tuberculosis in Africa. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2008 Sep [date cited]. <http://www.cdc.gov/EID/content/14/9/1345.htm>

Note: If the citation references an e-published ahead of print article, do not update the reference. The reference needs to reflect the source used at the time the reference was cited.

Other Electronic Citations

World Health Organization. Outbreak encephalitis 2005: cases of Japanese encephalitis in Gorakhpur, Uttar Pradesh, India. 2005 Oct 21 [cited 2006 Jul 11]. <http://w3.who.sea.org/en/Section1226/Section2073.asp>

ProMed Citations

Lipkin I. West Nile–like virus: PCR primers and protocols. *ProMed*. 1999 Oct 13. <http://www.promedmail.org>, archive no. 19991013.1826.

Foreign Language Citations

References published in a foreign language but translated into English should indicate the original language in brackets, after the article title.

Pablos-Mendez A, Lessnau K. Clinical mismanagement and other factors producing antituberculosis drug resistance [in Dutch]. *Journal name*;2000:159–76.

References that appear in a foreign language should be translated into English, if possible.

Address for Correspondence

Clearly identify the corresponding author and provide that author's mailing address, including phone number, fax number, and email address.

(The phone and fax number will not be published.) Only 1 author may be designated as corresponding, and only 1 address may be published for that author (i.e., corresponding author may not list 2 email addresses). Use American form of country names.

Mexico,	not	México
Peru,	not	Péru
Brazil, not Brasil		

For CDC addresses, list CDC only (spelled out), not CIOs; provide mailstop; include NE after Clifton Road.

John Doe, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd NE,
Mailstop X55, Atlanta, GA 30333, USA

Tables

Provide tables within the manuscript file, not as separate files. Use the MS Word table tool. Do not use any other program or tabs or spaces to align columns. If not formatted correctly, the tables will be returned to the author for proper formatting. Footnote any use of boldface. Tables should be no wider than 17 cm. Condense or divide larger tables. See section Formatting Tables and Formatting Figures for additional instructions. Place tables within manuscript after References.

Figures

Submit figures as separate files, in the native format when possible (e.g., Microsoft Excel, PowerPoint). Photographs should be submitted as high-resolution (600 dpi) .jpeg or .tif files. Other files may be acceptable; contact fue7@cdc.gov for guidance. Figures should not be embedded in the manuscript file. Use color only as needed. Use Arial font for figure lettering. Figures, symbols, lettering, and numbering should be clear and large enough to remain legible when reduced to print size. Large figures may be made available online only. Place figure keys within the figure. Figure legends should be provided at the end of the manuscript file. See Formatting Tables and Figures for additional instructions. Submit multiple panels as individual files. Do not submit multipanel panels. Place figure captions in manuscript after tables.

Videos

Submit as AVI, MOV, MPG, MPEG, and WMV. Videos should not exceed 5 minutes and should include an audio description and complete captioning. If audio is not available, provide a description of the action in the video as a separate Word file. Published or copyrighted material (e.g., music) is discouraged and must be accompanied by written release. If video is part of a manuscript, files must be uploaded with manuscript submission. When uploading, choose the file “Video” file. Include a brief video legend in the manuscript file. Your video upload will not convert to PDF, but will be available during the peer-review process.

Online-only Materials***Tables, Figures***

Tables and figures to appear online only should be numbered sequentially with tables and figures that will appear in print and are included in the manuscript maximum counts (e.g., no more than 2 tables and 2 figures total for a dispatch). Tables and figures that appear online only will be cited in text with a link to the online file. References within appendix tables or appendix figure legends are included in the manuscript maximum count (e.g., 15 for a dispatch) and should be numbered sequentially based on where the citations appear in text.

Technical Appendixes and Other Materials

For materials outside the scope of the article, authors may submit a Technical Appendix that will be presented online only. Technical Appendixes will be formatted but not edited; these materials are not included in the manuscript maximum word and reference counts. A link to the Technical Appendix will be provided in the text of the article where the materials are cited. Technical Appendixes that are surveys written in a language other than English may be printed in their original language.

Alternatively, readers may be referred to the corresponding author for supplemental materials, or authors may post supplemental materials on a separate website and provide a link to that site in the article.

Manuscript Submission

To submit a manuscript, assess Manuscript Central  from the Emerging Infectious Diseases website Author Resource Center (<http://wwwnc.cdc.gov/eid/pages/author-resource-center.htm>). Include a cover letter indicating the proposed category of the article (e.g, Research, Dispatch), verifying the word and reference counts and confirming that the final manuscript has been seen and approved by all authors. Complete provided Authors Checklist. Manuscripts (initial submissions as well as revisions) submitted by email will be returned.

10.2 Artigo

Trabalho a ser enviado para a revista: “Emerging Infectious Disease”

A new protozoan causing lesions in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Marianna V. Rodrigues^{1*}, Germano F. Biondi¹, Paulo Eduardo M. Ribolla¹, Diego P.

Alonso¹, João Pessoa Araújo Júnior¹

¹ Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

*Adress for correspondence: Marianna V. Rodrigues, Department of Veterinary and Public Health, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil; phone +55 1438800423; e-mail: mvazrodrigues@gmail.com.

Summary line

This research found new protozoan in all tissues of Nile tilapia (*Oreochormis niloticus*) from river and aquaculture, causing several lesions.

Abstract

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the one of the most commonly marketed and consumed fish species in the world. Several microorganisms can cause diseases in fish, including protozoans, viruses and bacteria. Because of a decrease in the quantity of Nile tilapia from the river and aquaculture of São Paulo State, Brazil, this study aimed to describe the lesions and identify the parasites present. One hundred sixteen Nile tilapia from aquaculture sources (56) and the river (60) were sampled. The fish underwent necropsy, histopathology, transmission electron microscopy, PCR, sequencing and phylogeny to identify the protozoan detected. An unknown protozoan was discovered in 100% of the analysed specimens. During the microscopy observation, we discovered many lesions containing granulomas, necrosis, and the protozoan in developmental stages similar to coccidian protozoan. Presence of macronucleus and micronucleus by electron microscopy and phylogeny results, suggests that the parasite could be *Telotrochidium matiense*.

Keywords: protozoan, fish, Nile tilapia, *Telotrochidium matiense*.

According to Food and Agriculture Organization (FAO 2010), the worldwide commercial production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) was 2,538,052 tons in 2010, corresponding to an estimated value of \$4 billion. This species is the eighth most important aquaculture and wild-captured fish in the world. China, Egypt, Indonesia, the Philippines, Thailand, and Brazil are the most important tilapia-producing countries (FAO Globefish 2010).

Although Nile tilapia is of economic importance for many countries, many pathogens (bacteria, viruses and parasites) can affect this species. There are a large number of parasites that can cause severe diseases in tilapia (Abdel-Ghaffar et al. 2008), which protozoan and monogenean parasites are the most common.

Between March 2010 and November 2012, Nile tilapia from aquaculture (Mira Estrela, São Paulo, Brazil) and wild catches (Botucatu, São Paulo, Brazil) were sampled for parasitology research. This study was performed because the number of fish had decreased significantly compared with the previous two years and because fishermen had begun to describe the fish's flavour as 'sour'. Preliminary results from histopathology and transmission electron microscopy analyses suggested that the parasites could belong to Apicomplexa phylum. Because of the low reports about protozoan infections and its pathology in fish, the objective of this research was to describe the lesions caused by the parasite, and identify the parasite using transmission electron microscopy and molecular techniques (PCR, sequencing and phylogeny).

The study

Between March 2010 and November 2012, 116 tilapia (*Oreochromis niloticus*) were randomly sampled from aquaculture net fishing (56) in Mira Estrela, São Paulo (19°55'47.52'' S, 50°08'36.56'' O) and from the Capivari river (60) in Botucatu, São Paulo (22°43'43'' S, 48°22'29'' O; Table 1). The fish were stored in boxes with innocuous ice used for seafood conservation and were immediately transported to the laboratory at University Estadual Paulista (UNESP) of Botucatu, São Paulo, Brazil, for necropsy and parasite identification.

Necropsy and parasite recovery

Necropsies were performed according to the method described by Moeller Jr. (2012). Briefly, the pectoral region was cut to the spine, and an incision was made from the abdominal cavity to the urogenital pore and extended from the gills to the anus. The plastron was removed to visualise parasites in the abdominal cavity. Subsequently, the fish were filleted to study the parasites or cysts. All samples were submitted to parasite

identification by faeces analysis, imprint, histopathology, transmission electron microscopy, PCR, sequencing and phylogeny.

Faeces analysis

The faeces of fish sampled were taken using a catheter, followed by Faust et al. (1938) and Fernández-Galiano (1994) protocols. According to Faust et al. (1938), faeces of the fish sampled were centrifuged-fluctuated in zinc sulphate for research of oocysts, and sporulation was performed as described by Raether et al. (1995). It was also used ammoniacal silver carbonate method according to Fernández-Galiano (1994) for ciliates and other structures observation.

Imprint

Heart and brain imprints of all fish were performed for research of the protozoans. This procedure was made during necropsy. After fixation with methanol, the slides were treated with Giemsa stain.

Histopathology

The liver, spleen, heart, gut, stomach, kidney, and muscle were fixed in 10% formaldehyde, stained with haematoxylin and eosin according to the method described by Junqueira and Carneiro (2004). To confirm the presence of protozoans, the slides were treated with Giemsa stain.

Transmission electron microscopy

Heart and muscle sections were fixed with Karnovsky's fixative (paraformaldehyde 2%, glutaraldehyde 2.5%, and cacodylate buffer 0.2 M, pH 7.2) (Rudnicki 2004). The samples then underwent dehydration, inclusion, resin embedding

and counterstaining with uranyl acetate, as described by Attias (2007). According to the same author, faeces and blood were counterstaining with phosphotungstic acid (PTA) 2% for parasite research. The ultra-structure was observed using a CM100 transmission electron microscope (Philips®).

PCR

For DNA extraction, it was weighted 20 mg of muscle, brain, and faeces, and placed in sterile cryo tubes containing 500 µL of Buffer (50 mM EDTA, 50 mM Tris, and 150 mM NaCl, pH 8.0), 60 µL of 10% SDS, and 25 µL ribonuclease A (10 ml⁻¹). Then, the samples were submitted to three cycles of freezing and heating (-80°C for 4 hours and 20°C for 4 hours), digested with 10 µL of proteinase K (10 mg/mL) at 60°C for 1 hour, and washed in columns using washing buffers of Wizard® SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA®) kit according to the manufacture's instruction. DNA was eluted in elution buffer (nuclease free water) and kept at -20°C until use.

The following pair of primers for PCR reactions was used: SFC-340f: 5'AGT-TTC-TGA-CCT-ATC-AGC3' and SFC-1260r: 5'TCA-GCC-TTG-CGA-CCA-TAC-TC3' complementary to the small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) coding regions of Apicomplexa (Kristmundsson et al., 2011). Amplification was performed in a 20 µl reaction using Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen®) mix in the concentration: Buffer 1X, dNTP 0.2mM, MgCl₂ 1.5mM, 0.2µM of each primer (SFC-340f and SFC-1260r), 1 unit of Platinum®Taq DNA Polymerase, and 3µl of DNA sample. As positive control was used *Toxoplasma gondii* RH (obtained of peritoneal liquid of balb/c mice with 40 days life of the UNESP's vivarium) and for negative control was used nuclease-free water.

The condition for PCR was: initial denaturation step at 95°C for 5 min followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 52°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min with a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products were observed on 1.5% agarose gel containing Sybr Safe (Invitrogen®), and visualized under ultraviolet light.

It was designed internal primers (Sense: 5'TAGGCCTTGCTGGACCATT3', and Antisense: 5'AGCCACCAATCTTTCTCCGTT3') for the sequence amplified by the primers: SFC-340f and SFC-1260r, which needs to recognize the target of the protozoan found, and not DNA from the Nile tilapia. The reaction conditions were the same of previous PCR.

DNA sequencing

The DNA was purified using Illustra Microspin™ S-400 HR Columns kit (GE Healthcare®) according to manufacturer's instruction. Big Dye Terminator Chemistry (Applied Biosystems) was used for reaction in the automated sequencing, and then the sample was conducted to capillary electrophoresis (Applied Biosystems, ABI 3500®).

The quality of electropherograms was performed in Sequencing Analysis version 5.4 (Applied Biosystems), and the sequences were aligning using the Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). For identification of the parasite species, the sequences were compared with genbank data.

Phylogeny

For phylogenetic analysis, taxa were chosen from BLAST searches that primers (SFC-340f and SFC-1260r) used in DNA amplification recognize, which were: *Cryptosporidium* spp., *Perkinsus*, *Eimeriidae*, *Telotrochidium matiense*, *Toxoplasma*

gondii, *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi*, *Besnoitia besnoti*, and *Sarcocystis* spp. As root was used sequence of *Oreochromis niloticus*. CLUSTAL_W (MEGA software version 5.1) was used for the initial sequence alignments with the settings for gap opening/extension penalties being adjusted manually to achieve optimum alignments. Regions of ambiguous sequence alignments were manually edited using the MEGA (version 5.1) sequence alignment editor.

Using MEGA, the software recommends model T-92 for our sequence as the most parameter-rich evolutionary model. Therefore, the settings used for analysis were nst=6, with the gamma-distributed rate variation across sites and a proportion of invariable sites (rates – invgamma). Taxa used in phylogenetic analyses were: our sequence, *Toxoplasma gondii* JF810959, *Neospora caninum* GQ899205, *Hammondia hammondi* EU025023, *Besnoitia besnoiti* JF314861, *Sarcocystis* spp. AB251613, *Cryptosporidium* spp. GQ227481, *Perkinsus* AF042707, Eimeriidae EF023730, *Telotrochidium matiense* EF417835, and *Oreochromis niloticus* XM_003440881 as root.

Results

No parasites were found during necropsy, but several lesions were observed, including skin darkening, haemorrhagic liquid in the abdominal cavity, liquefaction of the kidney, hepatomegaly, splenomegaly, and haemorrhages in the stomach and gut.

It was also observed unsporulated oocysts in faeces of 8 animals sampled from river. A few of oocysts started sporogony, suggesting that they have two sporocysts with two sporozoites each (Fig. 1). Using ammoniacal silver carbonate method and fluctuating in zinc sulphate stained with lugol for faeces from all animals caught was visualized cilia, macronucleus and micronucleus, besides globular cyst with thin wall

(Fig. 2 and 3). Heart and brain imprints presented protozoan in the cytoplasm of the red cells and in interstice.

Coagulation and liquefactive necrosis, inflammatory cells, eosinophils, granulomas, fibrous capsules around protozoan cysts protozoans, and bacteria colonies (Fig. 4 and 5) were observed. Protozoans were also visualised using Giemsa staining.

Transmission electron microscopy

Dense granules suggestive of parasites found in the Apicomplexa phylum were observed in one sample from muscle (Fig. 6). It was also observed macro and micronucleus, and globular cysts with a thin wall of faeces sampled (Fig. 7 and 8). Some structures are still unknown.

PCR, sequencing and phylogeny

Amplification of the small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) region produced a single band of about 700 bp for the all samples from fish of aquaculture and catch. The primers used didn't amplified negative control. After alignment, quality evaluation and exclusion of primer sequence, it was obtained a contig of 435 bp. However, the sequence shows trustful similarity with *Telotrochidium matiense* (EF417835) with 98% of identity (428/435 nucleotides) in BLAST analysis. To verify if the sequence really belongs to protozoan, it was design internal primers that amplify only the sequence of the parasite sequenced in the first reaction with primers SFC-340f and SFC-1260r. All organs (muscle, heart, and brain) amplified a product of 106 bp, and the negative control didn't present any band. When the sample was submitted to sequencing, the result showed that the amplification was exactly for the region of the first sequence.

Although, MEGA software recommended T92 model for phylogeny, we compared with GTR+I+G used by Kristmundsson et al. (2011) which studied apicomplexan of mollusk. Both methods have the same results. Phylogenetic analyses showed that *Telotrochidium matiense* formed a well-supported sister clade to our sequence (Fig. 9).

DISCUSSION

All samples taken from aquaculture and catch were infected by a protozoan parasite. For this reason, it was not possible to identify the sex, size and source risk factors for infection, and/or the development of the observed parasites. Our findings showed that the protozoan did not have a preference for any of the factors described above. However, Ghoneim et al. (2012) reported that the prevalence of *Giardia duodenalis* was higher in wild fish (*Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*; 4.5%, 2/44) than in cultured fish (2.1%, 1/48). The authors hypothesised that the difference could be the result of sampling because the majority of the fish analysed from the river were fingerlings, and during this phase these animals are more susceptible to infection because their immune system is incapable of eliminating the parasite.

A significant amount chemical contamination, such as from pesticides, has been found within the catch are of Nile tilapia (*O. niloticus*) in the Capivari River, Botucatu. In the region, pesticides are commonly applied to orange trees to protect the fruit from infestation. This leads to the pesticides' transport to the deeper layer of soil, called lixiviation, which contaminates the river, groundwater and the sea. People who live within this area also dispose of domestic waste and the organs of filleted fish in the river. These findings could explain the high occurrence of parasitism. Morley (2012) observed that reduced leukocyte phagocytic activity was associated with the presence of

chemical compounds (heavy metals) in the water. This hypothesis could be related to the fishes' susceptibility to infection in this case. Alternately, cultured fish could be suffering some type of stress, once it was observed high density of fish and a lot of organic material in the water that could lead to high incidences of parasitism.

Organ and skin haemorrhage and darkness, exophthalmia, splenomegaly, and hepatomegaly were all observed. Some studies of fish protozoan pathogeny have described similar lesions, including scoliosis (myxosporidian), haemorrhages (microsporidian, ciliates, and trypanosomatid), liquid in the abdominal cavity (microsporidian), hypertrophy/atrophy (myxosporidian), necrosis (myxosporidian and apicomplexan), and granuloma (ciliate, myxosporidian, microsporidian, and apicomplexan) (Bruno et al. 2006, Eli et al. 2012, Pádua et al. 2013). We noted that the symptoms of protozoan diseases in fish are very similar. Consequently, it was necessary to evaluate the lesion using microscopy and to identify the parasite using imprint, faeces fluctuation, histopathology, electron microscopy, PCR, sequencing and phylogeny analysis.

The oocysts observed in the faeces fluctuation suggest that the parasite belong to *Isospora* gender or other genera that produces oocyst with two sporocysts, which contains four sporozoites each. There is an important finding in the region of sampling. We observed a lot of birds that can eliminate in the water the oocysts that sporulate in the environment and affects fish. This hypothesis is due to toxoplasmosis, which can cause similar lesions in birds that we found in fish analyzed (splenomegaly, hepatomegaly, and necrosis). This protozoan could be detected in the blood and organ impression as we also found (Wettter 2012). However, these oocysts were only found in 8 animals, and ciliate protozoan were detected in all samples. This could suggest that

this coccidian is not the cause of the disease of the fish analysed or probably could have more than one specie causing disease in the animals analyzed.

Histopathology revealed that protozoan and inflammatory cells were present in all of the tissues analysed. Additionally, coagulation and caseification necrosis, vacuolar degeneration, oedema, macrophages, granuloma, bacteria colony, and parasite cysts were observed (Fig. 4). Both cultured and caught fish showed the same alterations. Protozoan morphology can be similar to that of Apicomplexa (in some tissues, shapes similar to sporozoites of the Eimeriidae family were observed) according to microscopic analysis, the brain was also sampled to evaluate lesions and investigate the presence of protozoans. Observations of the brain revealed encephalitis and the presence of the same protozoan (Fig. 5). These findings suggest that this parasite is highly pathogenic to the host (it was found in all tissues with severe lesions). The protozoans described in the literature that we analysed normally affect one or more organs, not all organs, as was the case for the fish analysed in our study. Although the majority of previous studies evaluated external parasites (Kuperman et al. 2001, Pantoja et al. 2012), including those that affect organs (Bruno et al. 2006, Florio et al. 2009, Eli et al. 2012), the protozoan we observed has never been previously described. This could be because the parasite is very similar to inflammatory cells. However, we observed that the cells have different sizes (Fig. 5). There are many descriptions of *Eimeria*, *Goussia*, *Calyptospora* in many species of fish, but normally it is detected the oocyst in the gut mucosal slides, which was not observed by us.

One of the most common host responses against parasites is the formation of cysts. The organism produces fibrous capsules that contain macrophages and fibroblasts. Many samples in our study presented this alteration. This mechanism is associated with parasite survival and dissemination because after another host consumes

the fish, the cyst is broken by enzymes in the stomach and the gut, freeing the parasite to infect the organs (Sitjá-Bobadilla 2008).

There are a few studies of the histopathology of protozoans in fish, but the findings that have been described are very similar to our observations. According to Paperna (1991), Bruno et al. (2006), El Mansy (2008), Eli et al. (2012), and Pádua et al. (2013), parasite infections by protozoans can be characterised by desquamation, ulcers, haemorrhage, congestion, hyperplasia, metaplasia, necrosis, inflammatory cells, oedema, macrophages, granulomas, nodules with fibrous capsules, and cysts. Bruno et al. (2006) and Eli et al. (2012) also reported that granulomas are very common in infections caused by *Cryptobia iubilans*, *Spironucleus salmonis*, *Balantidium*, *Sphaerospora*, *Plasmodia*, and *Henneguya*. However, these parasites have different sizes and morphologies compared to the parasite found in the present study.

Although histopathology and detection of the oocysts suggested that the protozoan detected belongs to Apicomplexa phylum, faeces analysis showed that all samples presented ciliate protozoan. The most interesting is the globular cyst (Fig. 3) observation that is very similar to cyst described by Martín-Cereceda et al. (2007), suggesting that the parasite of Nile tilapia could be *Telotrochidium matiense*. This ciliate is detected until now only in bioreactor and sludge, being used as indicators of the operation of the wastewater treatment plants (Ikeda-Ohtsubo et al., 2013; Martín-Cereceda et al., 2007; Ntougias et al., 2011). Our results could be the first report of *T. matiense* in animals causing disease.

Identification of macronucleus and micronucleus, globular cyst with thin wall by transmission electron microscopy suggests that the parasite found could belong to the family Opisthionectidae. However, some ultra structures that we observed are not similar

to this family, in some samples appear one bulk like cupping glass. This could be due to be a new specie or adaptation of parasite to multiply in the host.

Amplification of the small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) region and sequence obtained similar to *Telotrochidium matiense* (EF417835) suggests that the parasite found could belong to this specie. However, phylogeny results demonstrate that our sequence and *T. matiense* has a common ancestor, inferring that they could belong to the same family, gender or specie.

This could be the first report of *Telotrochidium matiense* causing disease in fish, since until now it is only described in bioreactor. However, it is necessary to conduct other studies aimed at the molecular characterisation, pathogenesis, life cycle establishment, and epidemiology of this parasite to establish measures of control and prevention that reverse the decrease in fish production and the associated increase in mortality.

LITERATURE CITED

- Abdel-Ghaffar F, El-Toukhy A, Al-Quraishy S, Al-Rasheid K, Abdel-Baki AS, Hegazy A, Bashtar AR (2008) Five new myxosporean species (Myxozoa: Myxosporea) infecting the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* in Bahr Shebin, Nile Tributary, Nile Delta, Egypt. *Parasitol Res* 103:1197-1205
- Attias M (2007) Desidratação, ultramicrotomia e contrastação. In: Campos APC, Haddad A, Sesso A, Madarim-de-Lacerda CA, Mingues FC, Weissmuller G, Rocha GM, Werckmann J, Miranda K, Medeiros LCS, Attias M, Farina M, Motta MC, Meirelles MN, Silveira M, Benchimol M, Monçores MC, Soares MJ, Pereira MCS, Barth OM, Corte-Real S, Zorn TMT, Souto-Padrón T, Lins UC, Souza W (eds)

Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas. Wanderley Souza, Rio de Janeiro, p. 37-50

Bruno DW, Nowak B, Elliot DG (2006) Guide to the identification of fish protozoan and metazoan parasites in stained tissue sections. *Dis Aquat Organ* 70:1-36

Eli A, Briyai OF, Abowei JFN (2012) A review of some parasite diseases of African fish gut lumen Protozoa, coccidiosis, *Cryptosporidium* infections, Haemoprotozoa, Haemosporidia. *ETASR* 4(11):1438-1447

El-Mansy A (2008) New exogenous stages of oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Goussia cichlidarum* Landsberg and Paperna 1985 (Sporozoa: Coccidia) and impact of endogenous stages on the swim bladder of tilapias in Egypt. *Parasitol Res* 102:233-241

Fantham MA, Porter A (1942) *Plasmodium struthionis*, sp. n., from Sudanese Ostriches and *Sarcocystis salvelini*, sp. n., from canadian speckled trout (*Salvelinus fontinalis*), together with a record of a *Sarcocystis* in the eel pout (*Zoarces angularis*). *Proc Zool Soc Lond* 113(1/2):25-30

FAO (2010) Yearbook of Fishery Statistics Summary Tables.

<ftp.fao.org/FI/STAT/summary/default.htm> (accessed 20 Feb 2013)

FAO Globefish (2010) Tilapia. www.globefish.org/tilapia-january-2010-china.html (accessed 20 Feb 2013)

Faust EC, D'Antoni JS, Odom V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie J, Walker JH (1938) A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. *Am J Trop Med Hyg* 18:169-183

Fernández-Galiano D. The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa from sewage (and other) waters. *Wat. Res.* 28(2):495-496, 1994.

Florio D, Gustinelli A, Caffara M, Turci F, Quaglio F, Konecny R, Nikowitz T, Wathuta EM, Magana A, Otachi EO, Matolla GK, Warugu HW, Liti D, Mbaluka R, Thiga B, Munguti J, Akoll P, Mwanja W, Asaminew K, Tadesse Z, Fioravanti ML (2009) Veterinary and public health aspects in tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus*) aquaculture in Kenya, Uganda and Ethiopia. *Ittiopatologia* 6:51-93

Ghoneim NH, Abdel-Moein KA, Saeed H (2012) Fish as a possible reservoir for zoonotic *Giardia duodenalis* assemblages. *Parasitol Res* 110:2193-2196

Junqueira LCV, Carneiro J (2004) *Histologia básica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

Kinkelin P, Michel P de, Ghittino P (1991) *Tratado de las enfermedades de los peces*. Zaragoza, Acribia

Kristmundsson A, Helgason S, Bambir SH, Eydal M, Freeman MA (2011) *Margolisiella islandica* sp. nov. (Apicomplexa: Eimeridae) infecting Iceland scallop *Chlamys islandica* (Müller, 1776) in Icelandic waters. *J Invertebr Pathol* 108:139-146

Kuperman BI, Matey VE, Hurlbert SH (2001) Parasites of fish from the Salton Sea, California, U.S.A. *Hydrobiologia*. 466, 195-208. Levine, N.D., 1970. Taxonomy of the sporozoa. *J Protozol* 56:208-209

Menezes SG (2011) *Parasitologia na medicina veterinária*. Roca, São Paulo

- Moeller Jr RB (2012) Fish necropsy and biopsy procedures. California Animal Health and Food Safety Laboratory System University of California. www.cichlid-forum.com/articles/fish_necropsy_biopsy.php (accessed 20 Sept 2012)
- Morley NJ (2012) The effects of radioactive pollution on the dynamics of infectious diseases in wildlife. *J Environ Radioact* 106:81-97
- Pádua SB, Martins ML, Carrijo-Mauad JR, Ishikawa MM, Jerônimo GT, Dias-Neto J, Pilarski F (2013) First Record of *Chilodonella hexasticha* (Ciliophora: Chilodonellidae) in Brazilian cultured fish: A morphological and pathological assessment. *Vet Parasitol* 191:154-160
- Pantoja WMF, Neves LR, Dias MRD, Marinho RGB, Montagner D, Tavares-Dias M (2012) Protozoan and metazoan parasites of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in Brazil. *Revista MVZ Córdoba* 17(1):2812-2819
- Paperna I (1991) Diseases caused by parasites in the aquaculture of warm water fish. *Annu ver Fish Dis* 155-194
- Raether, W., Hofmann, J., Uphoff, M., 1995. Cultivation and cryopreservation. In: Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W., Coudert, P. (Eds.), *Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 79–84.
- Rudnicki CAM (2004) Análise qualitativa e quantitativa das histopatologias causadas pelo organofosforado Azodrin®400 sobre o tecido branquial do peixe de água doce *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) após exposição subletal. Dissertation (Master in Biology Science) – Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 95 pp.

Sitjá-Bibadilla A (2008) Living off a fish: a trade-off between and the immune system.

Fish Shellfish Immun 25:358-372

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5:

Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,

Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and

Evolution 28:2731-2739

Wettered AJV (2012) Atoxoplasmosis in Poultry (Isosporosis, Lankesterellosis). The

Merck Veterinary Manual.

www.merckmanuals.com/vet/poultry/bloodborne_organisms/atoxoplasmosis_in_poultry.html (accessed 29 May 2013)

Table 1. Number of males and females and mean size of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) sampled from aquaculture and catch

Source	Species	Males (n)	Females (n)	$\bar{x}$ size	Total
Aquaculture ¹	Nile tilapia (<i>O. niloticus</i>)	53	3	16.00 cm	56
Catch ²	Nile tilapia (<i>O. niloticus</i>)	24	36	20.36 cm	60

¹ Grande River Basin, Água Vermelha reservoir, Mira Estrela, São Paulo

² Capivari River, Botucatu, São Paulo

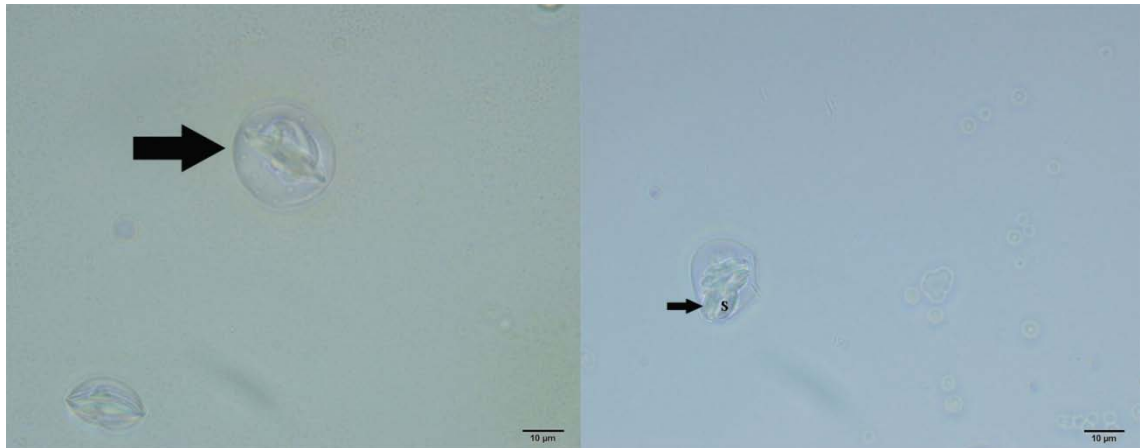


Fig. 1. Oocyst (large arrow), containing two sporocysts (thin arrow) with two sporozoites (S) in faeces of Nile tilapia (*O. niloticus*). Lugol stain.

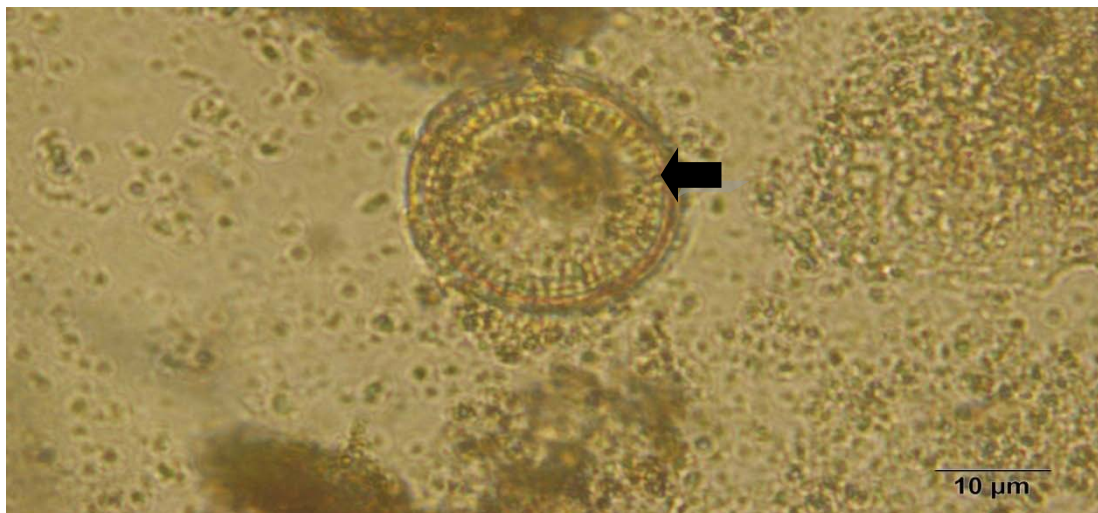


Fig. 2. Presence of cilia (arrow) of protozoan found in faeces. Ammoniacal silver carbonate method.

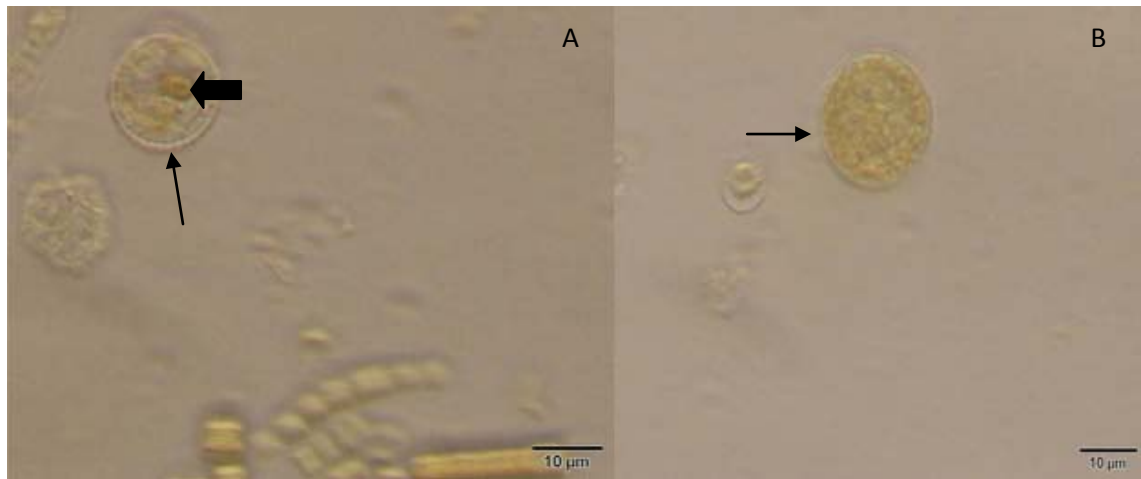


Fig. 3. A: Presence of cilia (thin arrow) and macronucleus (large arrow) of protozoan found in faeces. B: Globular cyst with thin wall (arrow). Centrifugation-fluctuation in zinc sulphate with Lugol's stained.

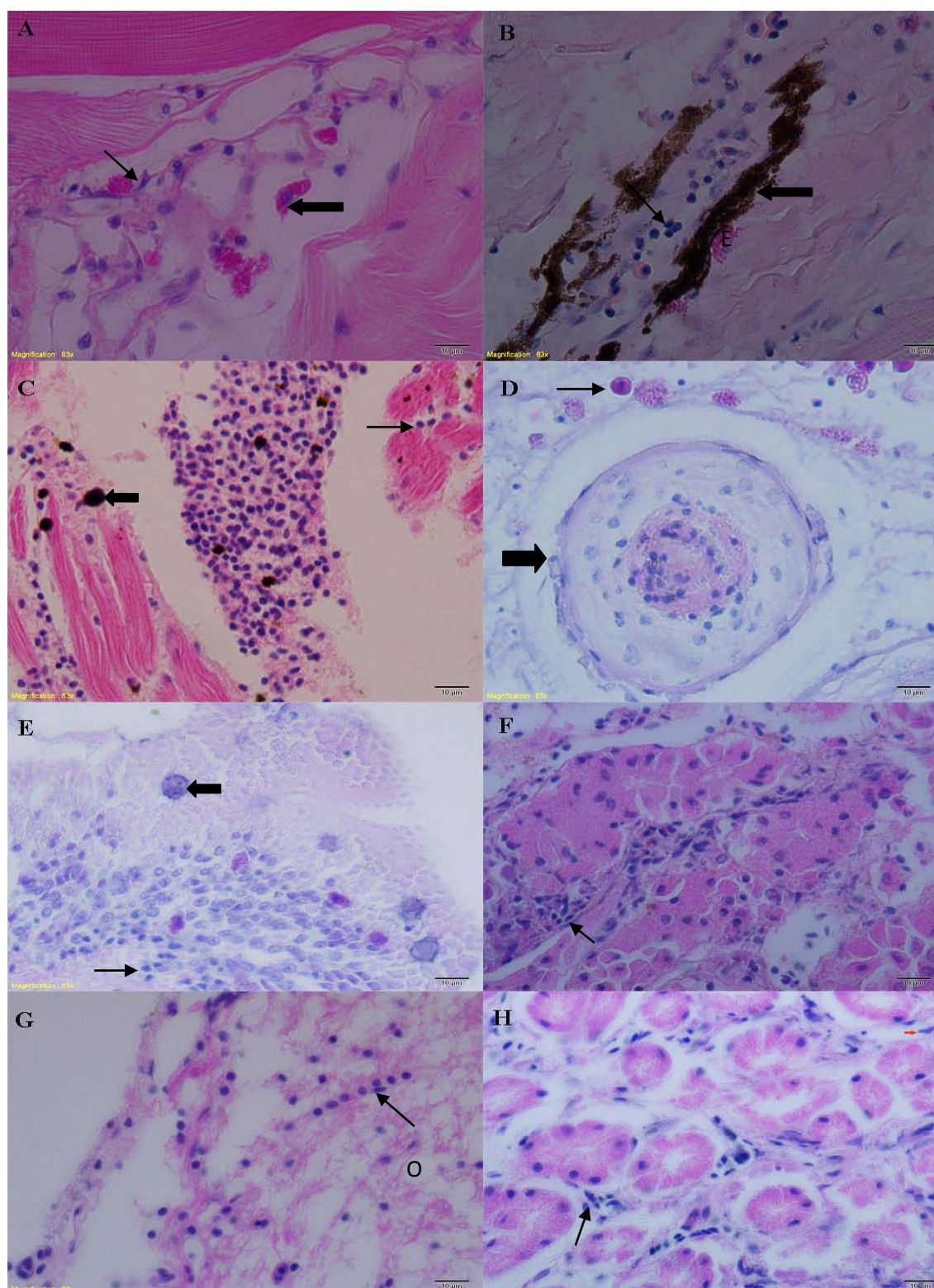


Fig. 4. Histopathology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). HE. A: Protozoans (thin arrow) and eosinophils (large arrow) in the muscle. B: Protozoan (thin arrow), eosinophils (E), and bacterial colonies (large arrow) in the muscle. C: Protozoan (thin

arrow) and bacteria colonies (large arrow) in the heart. D: Granuloma containing protozoan (large arrow) and eosinophils (thin arrow) in the gut. E: Protozoan (thin arrow) and structure suggestive of schizont (large arrow) in the gut. F: Protozoan (arrow) in the stomach. G: Protozoan (arrow) and oedema (O) in the brain. H: Protozoan (arrow) in the kidney.

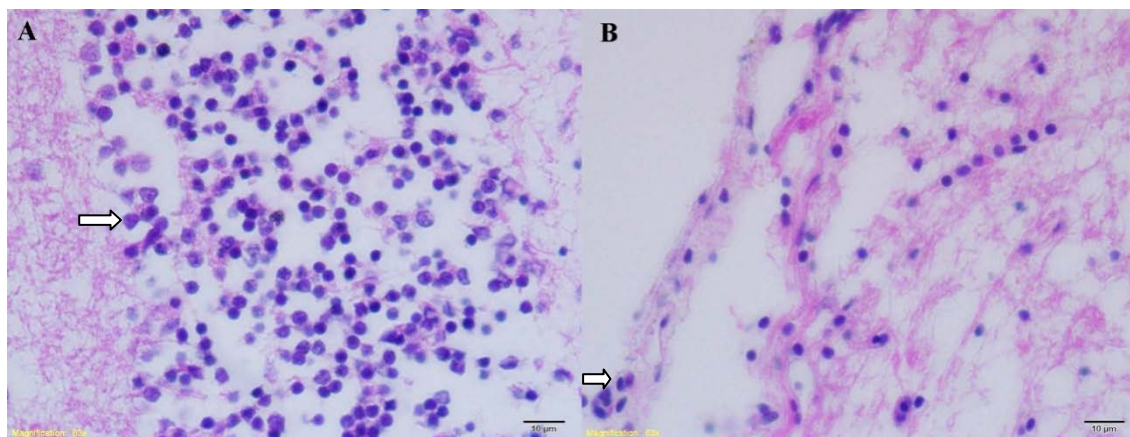


Fig. 5. Histopathology of Nile tilapia brain tissue. HE. A: Inflammatory cells (arrow) and oedema. B: Protozoan (arrow) and oedema.



Fig. 6. Dense granules (arrow) and nucleus (N) suggestive of Apicomplexa in muscle of Nile tilapia.

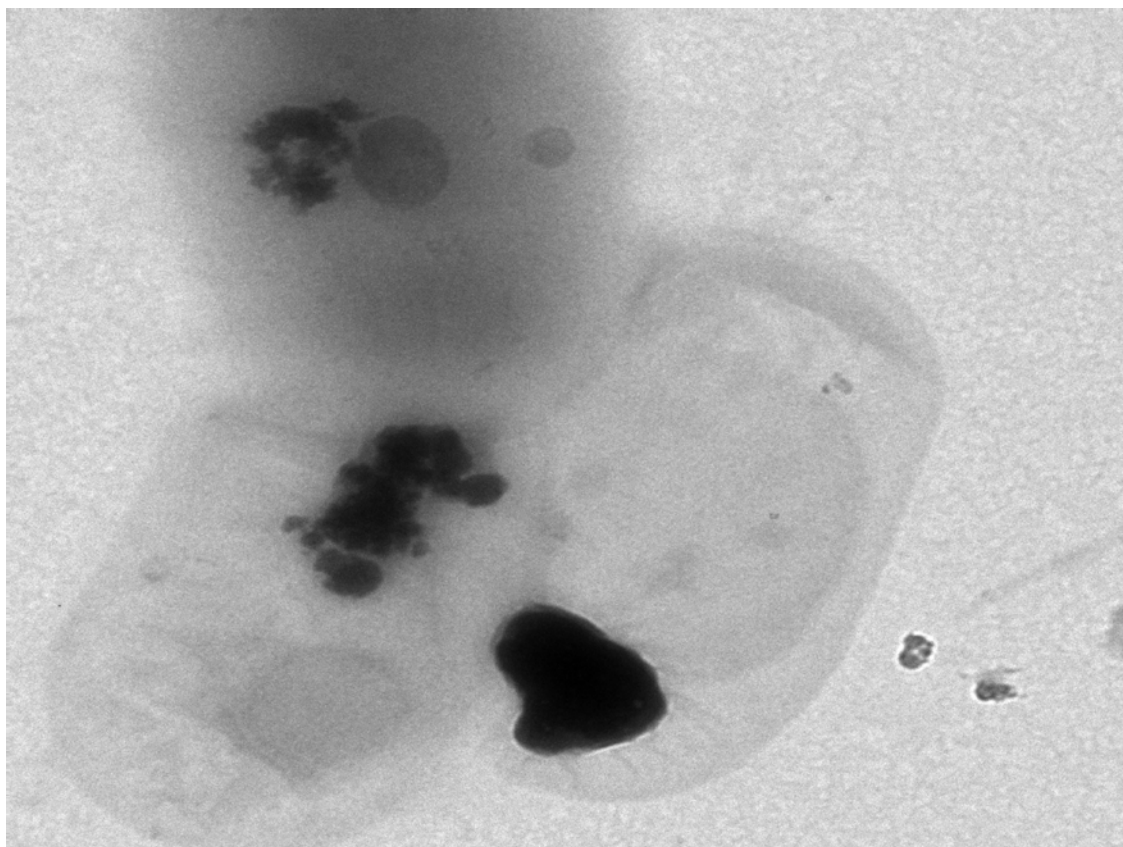


Fig. 7. Presence of macronucleus (MA) and micronucleus (MI). Magnification: 10000X.

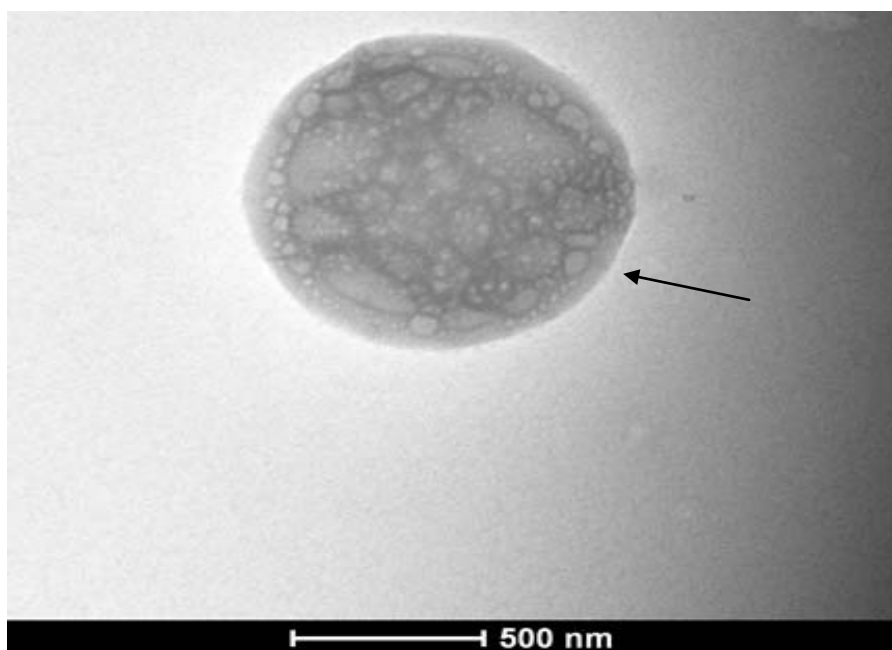


Fig. 8. Presence of globular cyst with thin wall (arrow) from faeces of Nile tilapia.

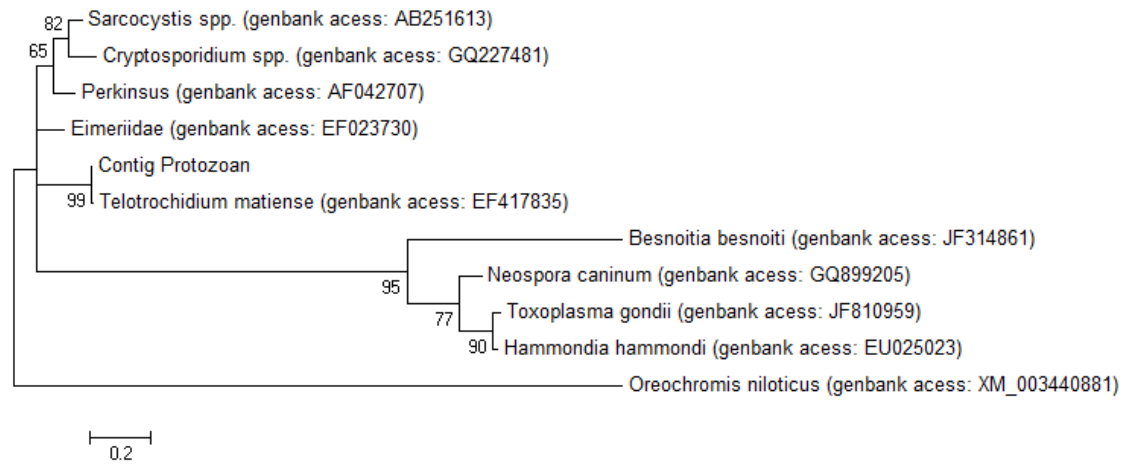


Fig. 9. Maximum likelihood tree as inferred using T92 model of nucleotide. It is observed that our sequence (Contig protozoan) has common ancestor with *Telotrochidium matiense*.