



**Estudo da ocorrência de *Mycobacterium* spp. e *Francisella* spp. em tilápias-do-Nilo e trutas de água doce e bijupirás de água marinha**

**Luara Lucena Cassiano**

**LUARA LUCENA CASSIANO**

**Estudo da ocorrência de *Mycobacterium* spp. e *Francisella* spp. em tilápias e trutas de água doce e bijupirás de água marinha**

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador:

Professor (a) Dra. Alessandra F. de Castro Nassar

Coorientador:

Professor (a) Dra. Ana Maria Cristina R. P. F. Martins

SÃO PAULO  
2022

Eu **Luara Lucena Cassiano**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: Luara Lucena Cassiano Data 13/05/22

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Cassiano, Luara Lucena.

Estudo da ocorrência de *Mycobacterium spp.* e *Francisella spp.* em tilápias e trutas de água doce e bijupirás de água marinha. / Luara Lucena Cassiano.  
- São Paulo, 2022.

97 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2021T.LC03

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.  
Linha de pesquisa: Gestão Sanitária e ambiental na produção animal.

Orientador: Alessandra Figueiredo de Castro Nassar.

Coorientador: Ana Maria Cristina R. P. F. Martins

Versão do título para o inglês: Study of occurrence of *Mycobacterium spp.* and *Francisella spp.* from Nile tilapia, freshwater trout and marine bijupira in Southeastern of Brazil

1. Granulomas 2. Imunohistoquímica 3. Hibridização *in situ* 4. PCR  
5. Aquicultura I. Cassiano, Luara Lucena II. Nassar, Alessandra Figueiredo de Castro III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2022/003

---



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA  
DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO BIOLÓGICO  
Pós-Graduação  
Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252  
Vila Mariana  
Caixa Postal 12898  
CEP 04010-970 - São Paulo / SP  
secretariapg@biologico.sp.gov.br



Curso Reconhecido de acordo com o disposto na Portaria MEC N° 609 de 14/03/2019 - D.O.U. 18/03/2019

ATA DA SESSÃO PÚBLICA PARA JULGAMENTO DA TESE DE DOUTORADO DE LUARA LUCENA CASSIANO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SANIDADE NO AGROECOSSISTEMA, DO INSTITUTO BIOLÓGICO.

Aos 27 de Janeiro de 2022 às 8h00min, na pós-graduação da sede do Instituto Biológico, a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Alessandra Figueiredo De Castro Nassar - Instituto Biológico (orientador), Prof. Dr. Leonardo Tachibana - Instituto de Pesca, Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa - USP Pirassununga, Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo - Embrapa Gado de Corte - MS, Prof. Dr. Cláudia Del Fava - Instituto Biológico se reuniu sob a presidência do primeiro a fim de proceder à arguição pública da TESE DE DOUTORADO de Luara Lucena Cassiano, intitulada: "Estudo da ocorrência de Mycobacterium spp. e Francisella spp. em tilápias-do-Nilo e trutas de água doce e bijupirás de água marinha no sudeste do Brasil". A sessão pública foi aberta pela Prof. Dr. Alessandra Figueiredo De Castro Nassar - Instituto Biológico, na qualidade de Orientadora e Presidenta da Comissão Examinadora, que passou a palavra para a candidata, para exposição oral de seu trabalho, com duração de até 45 minutos. Em seguida, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora que, em sessão secreta, deliberou pela APROVAÇÃO unânime da candidata. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata que, após ser lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Alessandra Figueiredo De Castro Nassar - Instituto Biológico

Prof. Dr. Leonardo Tachibana - Instituto de Pesca

Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa - USP Pirassununga

Assinatura

Prof. Dr. Flávio Ribeiro de Araújo - Embrapa Gado de Corte - MS

Prof. Dr. Cláudia Del Fava - Instituto Biológico

## **DEDICATÓRIA**

A eu mesma, pois só eu sei todo o esforço,  
paciência e dedicação que eu tive para  
concluir esse projeto da melhor forma  
possível.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, força e capacidade para elaborar este trabalho.

Aos meus pais, irmã e sobrinho, pessoas que eu amo muito, João Roberto Cassiano, Lucia Cristiane Lucena, Bianca Lucena Cassiano e Leandro Cassiano Santos, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, fazendo a minha vida muito especial, sempre batalharam muito para me ajudar a conquistar todos os meus sonhos.

Ao meu marido Lucio A. R. Mendes pelo imenso apoio, compreensão e amor. Sempre que necessário estava do meu lado aguentando os meus momentos de estresse, dificuldades, alegrias e conquistas.

Ao Rodrigo Barbosa de Souza por ser um amigo incrível que sempre me ajuda, me aguenta e por me fazer acreditar que eu sou capaz de realizar os meus almejos!

A Dra. Cristina C. Dib, Dra. Simone Miyashiro e ao Renato A. Ogata, que me ajudaram muito, me escutaram e me ajudaram a ter para conseguir chegar até o final e conquistar o meu título.

Ao Alexandre Lopes Gomes, por toda as idas ao laboratório de noite, de sábado, sem hora certa, para me fazer companhia e me ajudar nas análises em meio a essa pandemia, se mostrando um amigo especial.

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca Dra. Danielle de Carla Dias, Dr. Leonardo Tachibana e Dr. Carlos M. Ishikawa, porque sem eles eu não teria um projeto, me ajudaram em todas as coletas, me apresentaram esse universo da aquicultura que hoje eu aprecio tanto e por se mostrarem grandes amigos que posso contar sempre. Também aos alunos Crystal L. Conde e ao Guilherme N. Ferrez por sempre me ajudarem.

A Dra. Ana Maria Cristina R. P. F. Martins, por toda a ajuda, apoio, incentivo e por ser uma incrível mentora em todos esses anos que eu estive no laboratório. Uma pessoa com a qual pude contar em todos os momentos, me aconselhando e direcionando nas ocasiões em que tive dificuldades.

Ao Dr. Ricardo Harakava e seus alunos do laboratório por me acolherem e me ajudarem nas análises de sequenciamento do projeto.

A minha orientadora Dra. Alessandra F. C. Nassar por me orientar, sempre estando ao meu lado me ensinando, por deixar o laboratório a disposição e auxiliar no meu crescimento científico.

À Pós-graduação do Instituto Biológico de São Paulo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto (Processo número 2018/13393-4).

## **EPÍGRAFE**

“A ciência realmente só tem alcançado tornar mais intensa e forte uma certeza: - a velha certeza socrática da nossa irreparável ignorância. De cada vez sabemos mais - que não sabemos nada”.

**Eça de Queirós**

**CASSIANO, L.L.** ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE *Mycobacterium* spp. E *Francisella* spp. EM TILÁPIAS E TRUTAS DE ÁGUA DOCE E BIJUPIRÁS DE ÁGUA MARINHA NO SUDESTE DO BRASIL. 2022. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

## RESUMO

Na aquicultura (peixes, répteis, anfíbios e crustáceos), a ocorrência de enfermidades é uma preocupação constante, devido à rápida multiplicação de agentes patogênicos (bactérias, fungos, vírus e parasitas). Por esta razão, medidas adequadas de manejo e sanidade que visam segurança dos alimentos e o controle de patógenos devem ser constantes para o sucesso dessa atividade agropecuária. A *Francisella* spp. é um gênero bacteriano que causa uma doença granulomatosa conhecida por sua alta mortalidade em tilápia do Nilo cultivada comercialmente. Já o *Mycobacterium* spp. agente etiológico da tuberculose em peixes, é doença com significativa relevância para a saúde pública, devido ao seu caráter zoonótico. O objetivo do presente estudo foi identificar a presença de ambos os gêneros bacterianos em pisciculturas comerciais de tilápia-do-Nilo, bijupirás e trutas localizadas no sudeste do Brasil, por meio de técnicas de histopatologia, isolamento bacteriano, PCR, imunohistoquímica e hibridização *in situ*. Um total de 128 amostras clínicas (rim, fígado e baço) foram processadas para histologia, isolamento bacteriano, imunohistoquímica usando anticorpos policlonais e hibridização *in situ* com sondas biotiniladas específicas. Para a PCR, as amostras foram processadas utilizando os mesmos primers utilizados para a hibridização *in situ*, porém não biotiniladas. Na histologia em relação ao total das amostras, 46% (59/128) apresentaram granulomas, hemorragia em 67,9% (87/128), centros de melanomacrófagos em 85,9% (110/128) e presença de eosinófilos em 59,3% (76/128) no rim, baço e/ou hepatopâncreas. Já pela coloração de Fite-Faraco, 47,6% (61/128) das amostras apresentaram bacilos sugestivos de *Mycobacterium*. No isolamento bacteriano de *Francisella* spp., nenhuma das amostras foi positiva, e em relação a *Mycobacterium* spp., em 6,25% (8/128), das amostras houve crescimento de colônias, sendo identificadas duas espécies: *M. fortuitum* e *M. paragordoniae*. Ao PCR 28,9% (37/128) e 25% (32/128) das amostras foram positivas, respectivamente para *Francisella* spp. e *Mycobacterium* spp. Na imunohistoquímica para *Francisella* spp. 48,4% (62/128) das amostras apresentaram marcações positivas, e para *Mycobacterium* spp., 61,7% (79/128). Ao avaliar as amostras por hibridização *in situ* para *Francisella* spp., 52,3% (67/128) das amostras apresentaram marcações positivas, e para *Mycobacterium* spp., 57% (73/128). Portanto, no presente estudo, foi possível verificar a presença dos agentes estudados pelas diversas técnicas empregadas, e ainda identificar a coinfeção entre *Francisella* spp. e *Mycobacterium* spp., ressaltando a importância do rastreamento de agentes causadores de doenças granulomatosas, que acarretam perdas econômicas, além de apresentar um alto potencial zoonótico.

**Palavras-chave:** Granulomas, Imunohistoquímica, Hibridização *in situ*, PCR, isolamento bacteriano e Aquicultura



**CASSIANO, L.L.** STUDY OF OCCURRENCE OF *Mycobacterium* spp. AND *Francisella* spp. FROM NILE TILAPIA, FRESHWATER TROUT AND MARINE BIJUPIRA IN SOUTHEASTERN OF BRAZIL. 2022. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

#### ABSTRACT

In aquaculture (fish, reptiles, amphibians and crustaceans), the occurrence of diseases is a constant concern, due to the rapid multiplication of pathogens (bacteria, fungi, viruses and parasites). For this reason, adequate management and sanitation measures aimed at food safety and pathogen control must be constant for the success of this agricultural activity. *Francisella* spp. is a bacterial genus that causes a granulomatous disease known for its high mortality in commercially farmed Nile tilapia. *Mycobacterium* spp. etiological agent of tuberculosis in fish, is a disease with significant relevance to public health, due to its zoonotic character. The objective of the present study was to identify the presence of both bacterial genera in commercial fish farms of Nile tilapia, cobia and trout located in southeastern Brazil, using histopathology, bacterial isolation, PCR, immunohistochemistry and in situ hybridization techniques. A total of 128 clinical samples (kidney, liver and spleen) were processed for histology, bacterial isolation, immunohistochemistry using polyclonal antibodies and in situ hybridization with specific biotinylated probes. For PCR, samples were processed using the same primers used for in situ hybridization, but not biotinylated. In histology in relation to the total of samples, 46% (59/128) had granulomas, hemorrhage in 67.9% (87/128), melanomacrophages centers in 85.9% (110/128) and presence of eosinophils in 59.3% (76/128) in kidney, spleen and/or hepatopancreas. As for the Fite-Faraco stain, 47.6% (61/128) of the samples showed bacilli suggestive of *Mycobacterium*. In the bacterial isolation of *Francisella* spp., none of the samples was positive, and in relation to *Mycobacterium* spp., in 6.25% (8/128) of the samples there was growth of colonies, being identified two species: *M. fortuitum* and *M. paragordoniae*. By PCR 28.9% (37/128) and 25% (32/128) of the samples were positive, respectively for *Francisella* spp. and *Mycobacterium* spp. In immunohistochemistry for *Francisella* spp. 48.4% (62/128) of the samples showed positive stains, and for *Mycobacterium* spp., 61.7% (79/128). When evaluating the samples by in situ hybridization for *Francisella* spp., 52.3% (67/128) of the samples showed positive stains, and for *Mycobacterium* spp., 57% (73/128). Therefore, in the present study, it was possible to verify the presence of the agents studied by the different techniques used, and also to identify the coinfection between *Francisella* spp. and *Mycobacterium* spp., emphasizing the importance of tracking agents that cause granulomatous diseases, which cause economic losses, in addition to presenting a high zoonotic potential.

**Keywords:** Granulomas, Immunohistochemistry, *in situ* hybridization, PCR, bacterial isolation and Aquaculture

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tanques-rede da piscicultura comercial de tilápias-do-Nilo localizada no município de Santa Fé do Sul/SP, no reservatório da hidrelétrica de Ilha Solteira.	32
Figura 2 -	Tanques de alvenaria da piscicultura comercial de alevinos de bijupirás localizada no município de Ilha Bela/SP.	32
Figura 3 -	Tanques-rede da piscicultura comercial de bijupirás localizada no município de Ilha Grande/RJ.	33
Figura 4 -	Viveiros escavados da produção de tilápias-do-Nilo do Centro Experimental da APTA Regional localizada no município de Pirassununga/SP.	34
Figura 5 -	Tanques-escavados de alvenaria da produção de trutas da UPD de Campos do Jordão/SP.	35
Figura 6 -	Tanques-escavados de alvenaria da produção de trutas da UPD de Campos do Jordão/SP, onde ocorreu a coleta dos peixes de forma aleatória.	35
Figura 7 -	Anatomia interna de um peixe mostrando a disposição e nomenclatura dos órgãos.	38
Figura 8 -	<b>A.</b> Lesões na nadadeira peitoral em tilápia-do-Nilo capturada na piscicultura de Santa Fé do Sul/SP. <b>B.</b> Presença de granulomas no baço com esplenomegalia (ponta da tesoura) na mesma tilápia-do-Nilo após incisão da região ventral.	48
Figura 9 -	Presença de granulomas no rim encefálico (ponta da tesoura) e no fígado (seta preta) em tilápia-do-Nilo capturada em uma piscicultura de Santa Fé do Sul/SP.	48
Figura 10 -	Má-formação dorsal em tilápia-do-Nilo, capturada em uma piscicultura de Santa Fé do Sul/SP.	48
Figura 11 -	Fotomicrografia sugestiva do granuloma no baço de Bijupirá proveniente da piscicultura C (seta preta). (Aumento 100X).	50
Figura 12 -	Fotomicrografia sugestiva do granuloma no baço de Tilápia proveniente da piscicultura A1 (seta preta). (Aumento 400X).	50
Figura 13 -	Fotomicrografia sugestiva de inúmeros centros de melanomacrófagos no rim de Bijupirá proveniente da piscicultura B (seta preta) (aumento 100X).	50

Figura 14 -	Fotomicrografia sugestiva dos melanomacrófagos em fagocitose do granuloma no rim Bijupirá proveniente da piscicultura C (seta preta) (aumento 400X).	50
Figura 15 -	Fotomicrografia sugestiva dos bacilos álcool-ácidos resistentes corados pela técnica Fite Faraco no baço de uma Tilápia proveniente da piscicultura D1 (seta preta) (aumento 1000X).	52
Figura 16 -	Fotomicrografia sugestiva dos bacilos álcool-ácidos resistentes corados pela técnica Fite Faraco nas lamelas do arco branquial de Bijupirá proveniente da piscicultura C (seta preta) (aumento 1000X).	52
Figura 17 -	Resultado da eletroforese em gel de agarose (1,5 %) dos produtos de DNA amplificados por PCR a partir de amostras de DNA extraídas de espécimes de bijupirá de duas pisciculturas (B e C) localizadas no Estado de São Paulo, Brasil. Para as ampliações dos produtos de DNA, com tamanho esperado de 286 pares de bases (pb), empregaram-se pares de primers específicos para <i>Francisella</i> spp.	48
Figura 18 -	Resultado da eletroforese em gel de agarose (1,5 %) dos produtos de DNA amplificados por PCR a partir de amostras de DNA extraído.	53
Figura 19 -	Árvore filogenética dos isolados de <i>Mycobacterium</i> spp. Produto de amplificação por PCR convencional a partir de colônias isoladas e sequenciados pelo método de SANGER demonstradas pelos losangos em destaque.	54
Figura 20 -	Árvore filogenética da espécie <i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>orientalis</i> . Produto de amplificação por PCR convencional de amostra clínica e sequenciados pelo método de SANGER demonstradas pelos losangos em destaque.	55
Figura 21 -	Fotomicrografia de imunohistoquímica positiva para <i>Francisella</i> spp. no rim (seta preta) (aumento 400X).	58
Figura 22 -	Fotomicrografia de imunohistoquímica positiva para <i>Francisella</i> spp. no arco branquial (seta preta) (aumento 200X).	58
Figura 23 -	Fotomicrografia de imunohistoquímica positiva para <i>Mycobacterium</i> spp. no rim (seta preta) (aumento 630X).	59
Figura 24 -	Fotomicrografia de hibridização <i>in situ</i> positiva em marrom para <i>Francisella</i> spp. no rim (seta preta). (Aumento 400X).	60

- Figura 25 - Fotomicrografia de hibridização *in situ* positiva em marrom para *Francisella* spp. em um granuloma no baço (seta preta). (Aumento 200X). 60
- Figura 26 – Fotomicrografia de hibridização *in situ* positiva em marrom para *Mycobacterium* spp. em um granuloma no rim (seta preta). (Aumento 400X). 61
- Figura 27 – Identificação de *Francisella* spp. em água-doce e em água-salgada. **A.** Percentil de positividade das técnicas de imunohistoquímica (70,5%), hibridização *in situ* (48,9%), PCR (20,5%) e isolamento (0%) de *Francisella* spp. em peixes de água-doce, através de teste para identificação de duas proporções independentes. **B.** Percentil de positividade das técnicas de imunohistoquímica (47,5%), hibridização *in situ* (60%), PCR (47,5%), e isolamento (0%) de *Francisella* spp. em peixes de água-salgada. 62
- Figura 28 – Identificação de *Mycobacterium* spp. em água-doce e em água-salgada. **A.** Percentil de positividade das técnicas de imunohistoquímica (58%), hibridização *in situ* (55,7%), Fite-Faraco (50%), PCR (10,2%) e isolamento (9,1%) de *Mycobacterium* spp. em peixes de água-doce. **B.** Percentil de positividade das técnicas de imunohistoquímica (70%), hibridização *in situ* (60%), Fite-Faraco (55%), PCR (45%) e isolamento (0%) de *Mycobacterium* spp. em peixes de água-salgada, através de teste para identificação de duas proporções independentes. 64

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Estratégias e Atividades do Programa Aquicultura com Sanidade - Instrução Normativa Nº 4, de 04 de fevereiro de 2015.	24
Quadro 2 -	Protocolo para órgãos: desidratação, diafanização e embebição por parafina	38
Quadro 3 -	Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes, modificado segundo Michalany (1990)	39
Quadro 4 -	Protocolo de coloração Fite-Faraco (FITE et al., 1947)	39
Quadro 5 -	Margens de valores para classificar o grau de concordância do índice <i>Kappa</i> .	46
Tabela 1 -	Biometria dos animais por piscicultura.	47
Tabela 2 -	Caracterização bioquímica dos gêneros e espécies bacterianas isoladas em tilápias (83), bijupirás (40) e trutas (5).	49
Tabela 3 -	Achados histopatológicos no rim, baço, hepatopâncreas e arco branquial.	51
Tabela 4 -	Marcações positivas para <i>Mycobacterium</i> spp. e <i>Francisella</i> spp. através da técnica de imunohistoquímica por espécie de peixe e piscicultura.	57
Tabela 5 -	Resultados das marcações positivas para <i>Mycobacterium</i> spp. e <i>Francisella</i> spp. através da técnica de hibridização <i>in situ</i> por espécie de peixe e piscicultura.	59

Tabela 6 -	Índice de concordância <i>Kappa</i> entre testes diagnósticos de <i>Francisella</i> spp. em amostras de peixes de água doce.	65
Tabela 7 -	Índice de concordância <i>Kappa</i> entre testes diagnósticos de <i>Francisella</i> spp. em amostras de peixes de água salgada.	65
Tabela 8 -	Índice de concordância <i>Kappa</i> entre testes diagnósticos de <i>Mycobacterium</i> spp. em amostras de peixes de água doce.	66
Tabela 9 -	Índice de concordância <i>Kappa</i> entre testes diagnósticos de <i>Mycobacterium</i> spp. em amostras de peixes de água salgada.	67

## LISTA DE SIGLAS

<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
<b>IHC</b>	Imunohistoquímica
<b>ISH</b>	Hibridização <i>in situ</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>DGGE</b>	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
<b>MPA</b>	Ministério da Pesca e Aquicultura
<b>FNO</b>	<i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>orientalis</i>
<b>SOFIA</b>	<i>The State of World Fisheries and Aquaculture</i>
<b>POP</b>	Procedimento Operacional Padrão
<b>CETEA</b>	Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico
<b>IB</b>	Instituto Biológico
<b>APTA</b>	Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
<b>SAA</b>	Secretaria de Agricultura e Abastecimento
<b>UPD</b>	Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento
<b>TBE</b>	Tampão Tris/Borato/EDTA
<b>BEPE</b>	Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>F</b>	<i>Forward</i>
<b>R</b>	<i>Reverse</i>
<b>TBST</b>	Tampão Tris salina com Tween
<b>EP</b>	Erro padrão
<b>SAP</b>	Sem alterações histológicas
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>DAB</b>	3,3'-diaminobenzidina
<b>ATL</b>	Tampão de lise de tecido

## LISTA DE SIMBOLOS

<b>t</b>	toneladas
<b>km</b>	quilômetros
<b>km<sup>3</sup></b>	quilômetros cúbicos
<b>°C</b>	grau célsius
<b>%</b>	porcentagem
<b>n<sup>o</sup></b>	número
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>mg/L</b>	miligramas por litro
<b>µl</b>	microlitros
<b>µm</b>	micrômetros
<b>V</b>	volume
<b>M</b>	molaridade
<b>h</b>	horas
<b>U</b>	Unidades
<b>nM</b>	nano molar
<b>ml</b>	mililitros
<b>cód.</b>	código
<b>g</b>	gramas
<b>±</b>	Desvio padrão
<b>&lt;</b>	menor



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos.....	21
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
3.1. Aquicultura no Brasil .....	22
3.2. Legislação sobre as enfermidades na Aquicultura.....	23
3.3. Principais bacterioses na Aquicultura.....	25
3.4. <i>Mycobacterium</i> spp. (Micobacteriose dos peixes) .....	26
3.5. <i>Francisella</i> spp. (Franciselose).....	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1. Desenho experimental e animais.....	31
4.2. Locais de coleta.....	31
4.3. Anestesia.....	35
4.4. Laparotomia.....	36
4.5. Isolamento Bacteriano.....	37
4.5.1. <i>Francisella</i> spp. ....	37
4.5.2. <i>Mycobacterium</i> spp. ....	37
4.6. Histopatologia: Hematoxilina e Eosina (H&E) e Ziehl-Neelsen variação Fite Faraco.....	38
4.7. Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	40
4.7.1. <i>Francisella</i> spp. ....	40
4.7.2. <i>Mycobacterium</i> spp. ....	41
4.7.3. Sequenciamento pelo método de SANGER.....	42
4.8. Preparação do material para Imunohistoquímica e Hibridização <i>in situ</i> .....	43
4.8.1. Imunohistoquímica.....	43
4.8.2. Hibridização <i>in situ</i> .....	44
4.9. Análise Estatística.....	46
4.10. Análise de grau de concordância – <i>Kappa</i> .....	46
<b>5. RESULTADOS</b> .....	47
5.1. Biometria dos animais.....	47
5.2. Análise macroscópica.....	47
5.3. Isolamento Bacteriano.....	48
5.3.1 <i>Francisella</i> spp.....	49
5.3.2 <i>Mycobacterium</i> spp. ....	49
5.4. Histopatologia: Hematoxilina e Eosina (H&E) e Ziehl-Neelsen variação Fite Faraco.....	50
5.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	53
5.5.1 PCR para detecção da <i>Francisella</i> spp.....	53
5.5.2 PCR para detecção do <i>Mycobacterium</i> spp.....	54
5.6. Sequenciamento pelo método de SANGER.....	55
5.6.1 Sequenciamento colônias isoladas <i>Mycobacterium</i> spp. ....	55
5.6.2. Sequenciamento amostras positivas na PCR para <i>Francisella</i> spp...56	
5.7. Imunohistoquímica e Hibridização <i>in situ</i> .....	57
5.7.1. Imunohistoquímica.....	57
5.7.2. Hibridização <i>in situ</i> .....	59
5.8. Análise estatística .....	61

5.8.1. Análise comparativa entre as técnicas utilizadas para a <i>Francisella</i> spp. ....	61
5.8.2. Análise comparativa entre as técnicas utilizadas para o <i>Mycobacterium</i> spp. ....	63
5.9. Análise de grau de concordância – <i>Kappa</i> .....	64
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	68
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	77
<b>8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	79
<b>9. ANEXOS</b> .....	95
9.1. Certificado CETEA.....	95
9.2. POP coleta.....	96

## 1. INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira em 2020 teve um aumento de 5,93%, sendo que 60,6% da produção nacional referente à tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), enquanto as demais espécies como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o panga (*Pangasius hypophthalmus*) e truta (*Oncorhynchus mykiss*), representaram 10,9% dessa produção. A produção de pescado comparada com as demais fontes de proteínas foi a que obteve o maior índice de crescimento. O Brasil se manteve na quarta posição como maior produtor de tilápia do mundo e os estados que lideraram a produção foram: Paraná, São Paulo e Rondônia, somando mais de 292.000 toneladas de peixes de cultivo em tanques rede e escavados. Já a região sudeste, entre os anos de 2018 e 2019, apresentou um crescimento de 2,58% na produção (ANUÁRIO PEIXEBR, 2021).

A piscicultura marinha possui um enorme potencial econômico, porém representa uma porção pouco significativa na produção no Brasil. De acordo com a FAO (2018), o Brasil ainda não possui dados estatísticos sobre a produção de peixes marinhos (CHANG, 2003).

Conhecida como bijupirá ou cação-de-escamas, a espécie *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), possui carne saborosa, ótimo valor nutricional e alto potencial de reprodução, sendo um atrativo comercial para a piscicultura marinha brasileira e encontrada naturalmente em todo o litoral brasileiro (CHANG, 2003).

Na aquicultura (peixes, répteis, anfíbios e crustáceos), a ocorrência de enfermidades é uma preocupação constante, devido à rápida multiplicação de agentes patogênicos (bactérias, fungos, vírus e parasitas) (PILLAKY e KUTTY, 2005). Por esta razão, medidas adequadas de manejo e sanidade que visam segurança alimentar e o controle de patógenos devem ser constantes para o sucesso dessa atividade agropecuária (SAPKOTA et al., 2008; PILLAKY e KUTTY, 2005; GRIGORAKIS e RIGOS, 2011).

As infecções por bactérias provocam grandes perdas na produção por alta mortalidade ou pelo mau aspecto dos animais doentes, o que inviabiliza sua comercialização. Além disso, algumas bactérias podem ser zoonóticas causando preocupação (MILLER e NEELY, 2005; WANG et al., 2009).

*Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* são os principais agentes etiológicos da micobacteriose dos peixes, doença com uma significativa importância nas infecções transmissíveis dos peixes aos seres humanos. É uma doença crônica progressiva, encontrada em todo o mundo, que afeta peixes de água-doce, salgada e salobra, tanto em pisciculturas comerciais quanto em vida livre (WOLF e SMITH, 1999).

A bactéria *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* e *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* causam a franciselose nos peixes, doença granulomatosa globalmente conhecida pelos danos causados em pisciculturas comerciais e pela alta mortalidade em tilápias, principalmente. Limitações no diagnóstico de franciselose podem ser desafiadores, principalmente devido às dificuldades no isolamento bacteriano do agente, por se tratar de uma bactéria fastidiosa, podendo, assim, ocorrer subnotificação da doença (COLQUHOUN e DUODU, 2011). O único tratamento possível é por meio de antibióticos comerciais, não existindo vacina disponível para que haja um controle dessa enfermidade dentro das aquiculturas comerciais (SHAHIN et al., 2019). Estudos sobre a patofisiologia da infecção podem ajudar no entendimento da doença nos peixes, na prevenção e adequação das medidas de tratamento (CHERN e CHAO, 1994; SOTO et al., 2012).

São observados diversos entraves no diagnóstico de bactérias fastidiosas, o que estimula a busca de alternativas metodológicas. Cassiano et al. (2017) evidenciaram que a combinação de diferentes técnicas diagnósticas na identificação de microrganismos patogênicos em amostras teciduais, como imunohistoquímica (IHC), hibridização *in situ* (ISH) e PCR em amostras clínicas, podem favorecer o diagnóstico preciso dos agentes em questão.

Ao combinar técnicas morfológicas, imunológicas e bioquímicas, pode-se contribuir de modo promissor para o diagnóstico de agentes infecciosos (GIMENO, 1995). Portanto, para identificar a presença dessas bactérias é necessário a implementação de técnicas de identificação dos agentes etiológicos para obter uma análise eficaz e um maior controle dessas enfermidades, colaborando com o agronegócio aquícola nacional.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral:

- Verificar a presença e a caracterização fenotípica e genotípica de agentes bacterianos causadores de doenças granulomatosas em tilápias, bijupirás e trutas de pisciculturas comerciais do sudeste do Brasil.

### 2.2 Específicos:

1. Avaliar macro e microscopicamente órgãos de animais por necropsia e histopatologia.
2. Realizar tentativas de isolamento com meio de cultura específico para *Francisella* spp.
3. Realizar isolamento de *Mycobacterium* spp.
4. Realizar a detecção de *Francisella* spp. e *Mycobacterium* spp. através de PCR a partir de amostras clínicas.
5. Aplicar as técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ* para detecção de *Francisella* spp. e *Mycobacterium* spp.
6. Realizar o sequenciamento nucleotídico (SANGER) e análise de sequencias de produtos de PCR obtidos para *Francisella* spp. e *Mycobacterium* spp.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Aquicultura no Brasil

De acordo com o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), o Brasil possui a maior reserva de água doce do planeta, com mais de 8 mil km<sup>3</sup>, muito superior à do segundo colocado, a Rússia, com cerca de 4,5 mil km<sup>3</sup>. Além disso, possui um litoral com 7,4 mil km de extensão.

A aquicultura no Brasil iniciou-se a partir da importação de espécies, como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), entre outras. Essa prática comercial iniciou-se apenas na década de 1980, a partir de avanços tecnológicos, do desenvolvimento de técnicas de manejo e do surgimento das primeiras rações, além da alta demanda de pescueiros na região Sudeste (OSTRENSKY et al., 2008).

A produção de pescados é dividida entre a pesca extrativa e a aquicultura. A pesca extrativa baseia-se na retirada de recursos pesqueiros do ambiente natural e a aquicultura é o cultivo, normalmente em um espaço delimitado, de organismos aquáticos, tais como peixes, crustáceos, moluscos, algas, répteis e qualquer outra forma de vida aquática de interesse econômico produtivo (SCHULTER e VIEIRA FILHO, 2017). A aquicultura tem como atividades produtivas: piscicultura (cultivo de peixes); piscicultura marinha (cultivos de peixes em água marinha); maricultura (cultivo de organismos aquáticos marinho-estuarinos); algicultura (cultivo de algas); ostreicultura (cultivo de ostras); ranicultura (cultivo de rãs) e carcinicultura (cultivo de camarões) (SEBRAE, 2015).

De acordo com a Embrapa (2017), as espécies mais comuns produzidas no país, por região, são: Norte: tambaqui (*Colossoma macropomum*), pirarucu (*Arapaima gigas*) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus*); Nordeste: tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e camarão marinho (*Litopenaeus vanammei*); Centro-Oeste: tambaqui, pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*); Sudeste: tilápia-do-Nilo, pacu e pintado; e Sul: tilápia-do-Nilo, jundiá (*Rhamdia quelen*), ostra (*Crassostrea gigas*) e mexilhão (*Perna perna*).

O “*The State of World Fisheries and Aquaculture*”, conhecido como SOFIA (FAO - SOFIA, 2020), coloca o Brasil na 13ª posição na produção de peixes em cativeiro e o 8º na produção de peixes de água doce.

Os maiores produtores de peixes cultivados no Brasil por estado, em 2020, foram: 1º lugar: Paraná com 172.00t, em 2º lugar: São Paulo com 74.600t, em 3º lugar: Rondônia com 65.500t, em 4º lugar: Santa Catarina com 51.700t e em 5º lugar: Maranhão com 47.700t. A região Sudeste apresentou, no ano de 2020, um crescimento de 17,6% na produção, comparado ao ano de 2019 (ANUÁRIO PEIXEBR, 2021).

Em relação à piscicultura marinha, o Brasil teve um crescimento significativo entre 1990 e 2008 (CAVALLI e HAMILTON, 2009). As espécies que se destacaram pelo seu valor econômico são: robalo-peva (*Centropomus parallelus*) (ALVAREZ-LAJONCHERE e TSUZUKI, 2008), a garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*) (SANCHES et al., 2009), o ariocó (*Lutjanus synagris*) (SANCHES e CERQUEIRA, 2010) e o cioba (*Lutjanus analis*) (SANCHES et al., 2013). Além disso, o bijupirá (*Rachycentron canadum*) apresentou destaque na produção, por ser uma espécie de ampla distribuição geográfica e de características epipelágica, eurialina, euritérmica e migratória (BENETTI et al., 2010).

### **3.2. Legislação sobre as enfermidades na Aquicultura**

A Portaria 573 de 04/06/2003 instituiu o Programa Nacional dos Animais Aquáticos pelo MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), sendo publicado pelo MPA (Ministério da Pesca e Aquicultura) por meio da Instrução Normativa Nº 4, de 04 de fevereiro de 2015.

A Portaria número 19 de fevereiro de 2015, define, na forma de anexo, uma lista de doenças de notificação obrigatória de animais aquáticos ao Serviço Veterinário Oficial (SVO). Esta lista contém no item 13 a notificação obrigatória da infecção pela *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em *Oreochromis* spp., *Tilapia* spp., *Sarotherodon* spp. e híbridos (tilápia e seus híbridos).

Esses dispositivos legais objetivam prevenir, controlar e erradicar as enfermidades dos animais aquáticos (peixes, crustáceos, anfíbios, moluscos) por intermédio do

monitoramento e fiscalização sanitária animal, assegurando a oferta de produtos com qualidade e inocuidade para a população, a fim de salvaguardar a saúde pública.

O Programa “Aquicultura com Sanidade” (Quadro 1) foi criado em conjunto com o setor produtivo, a comunidade científica e de órgãos responsáveis pela Defesa Sanitária Animal nos Estados, a fim de elucidar questões fundamentais para a organização do mercado aquícola, possibilitando um padrão no cadastro sanitário de estabelecimentos aquícolas e de ações de atendimento às suspeitas de foco de doenças, bem como os planos de contingência, além da orientação de boas práticas de produção e biosseguridade.

**Quadro 1.** Estratégias e Atividades do Programa Aquicultura com Sanidade - Instrução Normativa Nº 4, de 04 de fevereiro de 2015.

#### **ESTRATÉGIAS DO PROGRAMA**

- Manter o serviço de promoção de saúde de animais aquáticos, prevenção, controle e erradicação de doenças que possam causar danos à produção animal, à economia e saúde pública e ambiental.
- Elaboração de políticas, normas e diretrizes de sanidade aquícola;
- Coleta de dados e informações com realização de análises de riscos de ocorrências de eventos sanitários;
- Programação, coordenação e execução de ações de vigilância zoossanitária;
- Elaboração de planos de contingência, de controle e de emergência para doenças de impacto;
- Planejamento, coordenação e implementação do sistema de informação zoossanitária e banco de dados correspondente, com o objetivo de facilitar a coordenação das atividades e o intercâmbio de informações;
- Programação, coordenação e execução da fiscalização do trânsito de animais, de produtos veterinários, de materiais de multiplicação animal, de produtos destinados à alimentação animal, produtos, subprodutos e derivados de origem animal, incluindo a aplicação de requisitos sanitários a serem observados na importação e exportação;
- Planejamento, coordenação e realização de estudos epidemiológicos para doenças de interesse em animais aquáticos;
- Planejamento, coordenação e execução de ações relacionadas às quarentenas animais e respectivos estabelecimentos quarentenários;



- Coordenação do sistema de alerta zoossanitário para notificação de riscos para a saúde animal e para informações que facilitem ação de gestão dos riscos rápida e adequada.

#### **ATIVIDADES DO PROGRAMA**

- Cadastro de estabelecimentos onde se mantém, cultivam e processam animais aquáticos;
- Inventário das populações de animais aquáticos;
- Fiscalização de trânsito de animais aquáticos e Produtos de Origem Animal;
- Cadastro dos profissionais atuantes em sanidade de animais aquáticos;
- Execução dos programas, projetos e atividades de educação sanitária em defesa sanitária animal;
- Cadastro dos estabelecimentos de comércio de produtos de uso veterinário;
- Cadastro dos laboratórios de diagnósticos de doenças de animais aquáticos;
- Inventário das doenças de animais aquáticos diagnosticadas;
- Execução de campanhas de controle e erradicação de doenças de animais aquáticos;
- Vigilância sanitária passiva e ativa;
- Ações de Defesa Sanitária Animal (atendimento a notificações, interdição, quarentena, depopulação, vazão sanitário, uso de sentinelas, repovoamento, desinterdição etc.)
- Orientação ao produtor rural sobre medidas profiláticas e de controle da sanidade na aquicultura;
- Controle de eventos agropecuários (exposições, feiras e leilões de animais)
- Certificação sanitária de estabelecimentos;
- Implementação e manutenção de informes nosográficos;
- Coordenação e execução das ações de epidemiologia;
- Emissão de documentação sanitária;
- Participação em levantamentos epidemiológicos de prevalência de enfermidades.

Fonte: Adaptado Defesa Agropecuária Estado de São Paulo.

### **3.3. Principais bacterioses na Aquicultura**

As bactérias que podem causar prejuízos econômicos muitas vezes são oportunistas, podendo estar presentes na microbiota e principalmente na água/ambiente em que os peixes vivem. Ao ocorrer um desequilíbrio no ambiente como: a baixa

qualidade da água, nutrição deficiente, estresse físico e/ou fisiológico, excesso de alimentação, alta densidade e até mesmo infestações por parasitas, podem ocorrer enfermidades (KUBITZA, 2008; LEIRA et al., 2016).

Segundo Leira e colaboradores (2016), inúmeras bactérias apresentam potencial patogênico, porém, dentre as que ocorrem com maior frequência e causam maior impacto econômico na produção comercial são: *Aeromonas* spp, *Edwardsella* spp, *Flavobacterium columnare*, *Francisella* spp, *Streptococcus* spp., *Vibrio* spp. e *Mycobacterium* spp.

Os sinais clínicos que os peixes podem desenvolver são: letargia com perda de apetite; natação errática ou com movimentos espiralados; escurecimento ou lesões nas nadadeiras; hemorragias puntiformes pelo corpo; manchas brancas; úlceras na pele; ascite; exoftalmia e alta mortalidade. Na necropsia dos peixes, podem ser observados grânulos brancos no fígado, baço e rim; hemorragia nos órgãos internos; esplenomegalia; alteração de cor e alterações como fluído sanguinolento no intestino, entre outras alterações (KUBITZA, 2008).

Boas práticas de manejo ainda são as mais adequadas para prevenir morbidade e mortalidade. No entanto, um diagnóstico preciso e confiável se faz necessário dentro de um programa de detecção e controle de enfermidades em pisciculturas (LEIRA et al., 2016).

### **3.4. *Mycobacterium* spp. (Micobacteriose dos peixes)**

O gênero *Mycobacterium* foi descrito pela primeira vez em 1870 como sendo o responsável por causar a hanseníase. Já em 1882, foi isolada a espécie causadora da tuberculose e, no final do século XXI o isolamento de micobactérias de diversas espécies de aves, répteis, mamíferos e peixes já havia ocorrido (WOLINSKY, 1979).

*Mycobacterium* spp. é responsável por uma doença granulomatosa sistêmica, podendo ser aguda ou crônica. Essa bactéria é um bacilo delgado, reto ou ligeiramente curvo, de crescimento lento, imóvel e não esporulado e tem como característica principal ser álcool-ácido-resistente, possuindo na parede celular um alto teor de lipídeos e

produzindo ácidos graxos denominados ácidos micólicos, corando-se, desta forma, pela coloração de Ziehl- Neelsen (WAYNE e KUBICA, 1986).

As micobactérias estão disseminadas também em reservatórios aquáticos. As duas espécies principais que causam micobacteriose em peixes são: *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium fortuitum*, espécies zoonóticas, além de outras espécies como: *M. chelonae*, *M. neoaurum*, *M. simiae* e *M. scrofulaceum* (NOGA et al, 1990; ISHIKAWA et al, 2001; SPICKLER, 2006; JACOBS et al, 2009). Essas espécies são identificadas como micobactérias não tuberculosas, não pertencentes ao complexo respiratório (NOVOTNY et al. 2004).

A espécie *M. marinum* foi isolada pela primeira vez em 1926, no fígado, baço e rim de peixes marinhos do Aquário da Filadélfia (GARCÍA et al., 2006; JALÉD et al., 2010). A espécie pode se proliferar dentro de fibroblastos, macrófagos e células epiteliais em peixes (DECOSTERE et al., 2004). A gravidade das infecções varia desde as crônicas, sem grandes alterações teciduais em que poucos peixes morrem, até as infecções agudas e graves com alta mortalidade (COLLINS et al., 1985; DECOSTERE et al., 2004; SLANY et al., 2013). Antigamente, os surtos de *M. marinum* em humanos eram esporádicos e associados a piscinas contaminadas, sendo conhecido como ‘granuloma de piscina’ ou ‘granuloma de aquário’, causando lesões granulomatosas na pele; porém, o uso do cloro reduziu a frequência dos surtos (SLANY et al., 2013).

O *M. fortuitum* pode provocar granulomas de pele nos humanos, devido ao manuseio de peixes infectados e relatos indicam que a infecção pode evoluir para infecções pulmonares em humanos (NIGRELLI e VOGEL, 1963; BRAGG et al., 1990).

Os sinais clínicos causados pelo *Mycobacterium* são variados e não específicos como os das demais doenças bacterianas que acometem os peixes como: anorexia, letargia e apatia, lesões em pele como úlceras, presença de áreas hemorrágicas, distensão abdominal, exoftalmia, deformidade na coluna, lesões, alterações irreversíveis das nadadeiras, entre outros sintomas. A forma aguda da doença é mais rara, caracterizada por poucos sinais clínicos e alta mortalidade (GIAVENNI et al., 1980).

O diagnóstico para a micobacteriose nos peixes é difícil devido à característica do agente (fastidioso); portanto, é quase sempre baseado na observação do bacilo ácido resistente em cortes seriados de tecido ou citologia por decalque, em coloração de Ziehl-

Neelsen (WHIPPS et al., 2003). Microscopicamente, nota-se formação de granulomas de origem epitelióide ou imune, característicos de partículas insolúveis, lesões típicas do microrganismo. Os granulomas são capazes de induzir uma resposta imune e seu centro pode ser preenchido por necrose caseosa.

O isolamento bacteriano em meios específicos é conhecido como “padrão ouro”, e fornece diagnóstico definitivo. Os meios utilizados são: Petraghani e/ou Löwenstein-Jensen, descontaminados pela técnica de Petroff e incubados à 37°C por pelo menos 90 dias, com observação inicialmente diária e depois semanal. O crescimento positivo sugestivo de micobactéria é indicado pelo aparecimento de colônias com coloração amarelada a alaranjada (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979; CORNER, 1994).

O tratamento das micobacterioses em peixes ainda é limitado e às vezes sem sucesso. Métodos como: banho; injeção intraperitoneal de Canamicina; estreptomicina; incorporação de isoniazida e o uso da rifampicina na ração podem ser utilizados. Porém não eliminam a bactéria dos tanques dos peixes afetados. A infecção é controlada, segundo SPICKLER (2006), com o abate dos peixes e desinfecção dos tanques e equipamentos que entram em contato com os animais infectados.

A prevenção sempre é o melhor caminho para não ocorrer a infecção dos animais nas pisciculturas. Comprar peixes de propriedades reconhecidamente livres de doenças, respeitando o período de quarenta para peixes importados, além do manejo correto dos animais, ajudam a prevenir não só as micobacterioses, mas diversas outras doenças que acometem os peixes (SPICKLER, 2006).

### **3.5. *Francisella* spp. (Franciselose)**

O gênero *Francisella* foi descrito pela primeira vez em 1922 pelo bacteriologista americano Edward Francis (1872-1957), como *Francisella tularensis*, agente causador da tularemia em humanos (SRIDHAR et al., 2012; SOTO et al., 2013).

As bactérias do gênero *Francisella* spp. são extremamente virulentas para diversas espécies animais e foram encontradas em peixes marinhos e de água doce, anfíbios,

répteis e mesmo em moluscos. É um patógeno emergente que causa doença tanto crônica, quanto aguda em diversas espécies de peixes selvagens e cultivados, e associado a massivas mortalidades de tilápia em cultivos comerciais em Taiwan, Havaí e Costa Rica (HSIEH et al., 2006; MAUEL et al., 2007; SOTO et al., 2009).

Os primeiros relatos no Brasil ocorreram no inverno dos anos de 2012 e 2013, em Minas Gerais, em alevinos e juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (LEAL et al., 2014).

As bactérias do gênero *Francisella* são cocobacilos, imóveis, Gram-negativas, estritamente aeróbias, intracelulares facultativas e extremamente fastidiosas. São conhecidas duas subespécies de *Francisella noatunensis*: *Francisella noatunensis* subsp. *noatunensis* e *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (FNO) (SOTO et al., 2019).

Apresentam catalase positiva, oxidase negativa, redução de nitrato a nitrito negativo, cisteína arilamidase, com crescimento ideal entre as temperaturas 15-22°C *in vitro*, dependendo da espécie. Essa característica de crescimento em temperaturas mais baixas sugere que o maior risco de surtos ocorre principalmente no inverno (BIRKBECK et al., 2011; GONÇALVES, 2015).

De acordo com Soto et al. (2009), essa doença não apresenta sinais clínicos específicos, porém os peixes podem apresentar perda do apetite, palidez, comportamento letárgico, natação errática, áreas hemorrágicas focais, perda de escamas, lesões nas nadadeiras, exoftalmia, renomegalia e esplenomegalia. Nos órgãos internos, como baço, rim e hepatopâncreas, os animais infectados apresentam um grande número de nódulos brancos e, nas brânquias, hiperplasia epitelial. Essas lesões contêm acúmulo citoplasmático de bactérias e por isso é comum a presença de vasculite necrotizante focal e difusa, principalmente no baço e rim, resultando na formação dos granulomas (MAUEL et al., 2007).

A FNO tem a capacidade de interagir com diferentes receptores das células fagocíticas, células epiteliais e células dendríticas (HALL et al., 2007; KAMAISHI et al., 2010; SOTO et al., 2010). As células fagocíticas são essenciais no controle inicial de infecções por fagocitar os agentes patogênicos e na formação de fagolisossomos que degradam esse conteúdo. Entretanto, as bactérias intracelulares, incluindo o gênero *Francisella*, são capazes de desenvolver uma resistência à ação do fagolisossomo, não

sendo degradadas, sobrevivendo dentro da célula (GOLOVLIOV et al., 2003; CLEMENS et al., 2004; SANTIC et al., 2005; BIRKBECK et al., 2011).

A virulência da bactéria está associada a genes que codificam o *loci* de crescimento intracelular (*iglA*, *iglB*, *iglC* e *iglD*). Esses genes parecem ser essenciais para a capacidade de sobrevivência da *F. tularensis* dentro de macrófagos e causarem a doença (NANO et al., 2004; NANO e SCHMERK, 2007).

As características fastidiosas dificultam o diagnóstico laboratorial da franciselose tornando-o um desafio, pois a presença de outros patógenos podem inibir o crescimento desta bactéria e elevar a subnotificação do problema (COLQUHOUN e DUODU, 2011). O tratamento atual é a utilização de antibióticos e ainda não está disponível uma vacina segura e eficiente no mercado para o controle dessa enfermidade nos animais aquáticos (SHAHIN et al., 2019).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Os procedimentos realizados no presente projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB), registrado sob o número do protocolo CETEA 169/20 (Anexo 1).

Para a coleta das amostras a campo foi elaborado o manual de Procedimento Operacional Padrão (POP) (Anexo 2), contendo todas as etapas da coleta, desde a anestesia, eutanásia, coleta, alíquota e transporte das amostras.

### **4.1. Desenho experimental e animais**

Foram coletadas tilápias-do-Nilo, bijupirás e trutas-arco-íris em pisciculturas comerciais do sudeste do Brasil, sendo seis pisciculturas de tilápia, duas de bijupirá e uma de truta. Os animais foram capturados de forma aleatória, mas que em algum momento da produção apresentaram sintomatologia clínica, como: lesões nas nadadeiras peitorais e dorsais, hemorragias puntiformes ao longo do corpo, exoftalmia, natação errática e morbidade.

Após as coletas, todas as amostras foram encaminhadas para os laboratórios do Instituto Biológico de São Paulo, SP, para serem processadas.

### **4.2. Locais de coleta**

A primeira coleta foi realizada no mês de agosto de 2017, na cidade de Santa Fé do Sul, SP, que faz parte do reservatório da hidrelétrica de Ilha Solteira. Nesta região encontra-se o maior polo de produção de tilápia do Estado de São Paulo, com pisciculturas que utilizam sistemas de produção em tanque-rede (Figura 1). Foram visitadas cinco pisciculturas (denominadas A1, A2, A3, A4 e A5). Na primeira piscicultura (A1), com suspeita de surto de *Francisella* spp. de acordo com o proprietário da piscicultura; foram coletados 20 peixes, e nas demais pisciculturas (A2, A3, A4 e A5), 10 peixes. Os animais foram transportados em caixas de coleta de 1.000L com oxigênio para o Centro de Pescado Continental do Instituto de Pesca, alocado na cidade de São José do Rio Preto – SP, local onde a equipe fez a eutanásia, necropsia e posterior coleta de amostras de órgãos dos peixes.



**Figura 1** – Tanques-rede da piscicultura comercial de tilápias-do-Nilo localizada no município de Santa Fé do Sul/SP, no reservatório da hidrelétrica de Ilha Solteira.

A segunda coleta, na piscicultura B, foi realizada no mês de março de 2018 em Ilhabela/SP. A piscicultura era de produção de alevinos de bijupirás em tanque escavado. Foram coletados 20 alevinos (Figura 2). Os animais foram anestesiados e eutanasiados conforme descrito no POP e as amostras de órgãos foram coletadas na própria piscicultura em uma instalação laboratorial do proprietário.



**Figura 2** – Tanques de alvenaria da piscicultura comercial de alevinos de bijupirás localizada no município de Ilha Bela/SP.



A terceira coleta, na piscicultura C, de engorda de bijupirás em tanque rede, foi realizada no mês de agosto de 2018, em Ilha Grande, RJ. (Figura 3). Foram coletados 20 peixes em tanques aleatórios, animais de tamanho e peso variados e idades diferentes. Os animais foram anestesiados e eutanasiados e as amostras coletadas na própria piscicultura em uma instalação laboratorial.



**Figura 3** – Tanques-rede da piscicultura comercial de bijupirás localizada no município de Ilha Grande/RJ.

A quarta coleta foi realizada no mês de fevereiro de 2019 em Pirassununga/SP, na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) do Instituto de Pesca – APTA – SAA. Esta unidade é composta de viveiros escavados utilizados para crescimento de tilápias e foi denominada piscicultura D (Figura 4). Foram coletados 12 peixes com tamanho e peso variados, devido aos diferentes estágios de desenvolvimento das tilápias. Os animais foram anestesiados e eutanasiados e as amostras coletadas no próprio local onde existe uma estrutura laboratorial para análises.



**Figura 4** –Viveiros escavado da produção de tilápias-do-Nilo do Centro Experimental da APTA Regional localizada no município de Pirassununga/SP.

A quinta coleta foi realizada em março de 2020, na piscicultura E, localizada em Campos do Jordão, SP, na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) do Instituto de Pesca. A UPD de Campos do Jordão é referência nacional em truticultura e realiza pesquisas pioneiras sobre feminização indireta dos peixes e tecnologia para o melhoramento da salmonização em trutas.

A escolha do local para coleta foi devido à alta mortalidade de peixes com suspeita de doenças infecciosas com sinais clínicos, como: lesões nas nadadeiras, hemorragias puntiformes e exoftalmia (Figura 5 e 6).

Foram coletados cinco peixes com tamanho e peso variados para posterior análise no Instituto Biológico - SP. Os animais foram anestesiados e eutanasiados e as amostras coletadas no próprio local onde existe uma estrutura laboratorial.



**Figura 5.** Tanques-escavados de alvenaria da produção de trutas da UPD de Campos do Jordão/SP.



**Figura 6.** Tanques-escavados de alvenaria da produção de trutas da UPD de Campos do Jordão/SP, onde ocorreu a coleta dos peixes de forma aleatória.

A sexta coleta foi realizada em Pirassununga (piscicultura D2), no mês de março de 2020, para continuação do monitoramento no local. Foram coletados 11 peixes (tilápias-do-Nilo) com tamanho e peso variados. Os animais foram anestesiados e eutanasiados e as amostras coletadas no próprio local onde existe uma estrutura laboratorial para coleta de amostras.

### 4.3. Anestesia

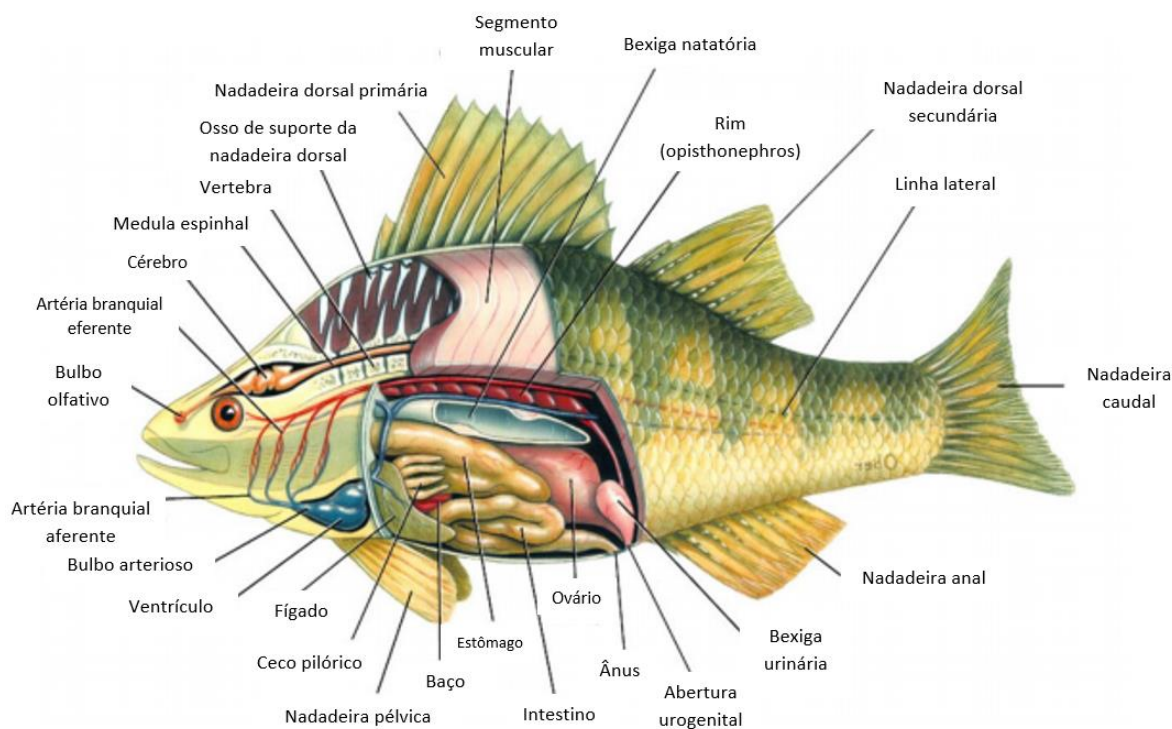
Os animais foram anestesiados por imersão em solução de água contendo Eugenol® na concentração de 120 mg/L. Após a anestesia, foi realizada a biometria e a eutanásia ocorreu por secção da medula (CARVALHO, 2010).

#### 4.4. Laparotomia

Os animais foram colocados em prancha cirúrgica, em decúbito lateral, realizada a antisepsia da parede ventral com álcool a 70% e posterior colocação dos campos cirúrgicos fenestrados e esterilizados. Foi realizada a abertura na região ventral por incisão longitudinal mediana de todos os planos anatômicos (Figura 7), utilizando-se bisturi e tesoura tipo Mayo-Hegar reta. Em seguida, foi exposto o intestino e o hepatopâncreas rebatendo-os para o isolamento do baço. Após a coleta do hepatopâncreas e baço, foram realizadas a dissecação de todas as estruturas para acessar o tecido conjuntivo que reveste o rim. O opérculo foi rebatido expondo-o e um fragmento foi retirado com a ajuda da tesoura. Em todos os procedimentos dissecatórios, foi utilizado o instrumental microcirúrgico em condições de total assepsia.

Após a colheita, os órgãos foram seccionados e divididos em quatro fragmentos, um fixado em formalina tamponada 10%, destinado para análise histopatológica, outro colocado em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) para análise bacteriológica e os outros dois congelados separadamente em tubos de coleta, um para o isolamento do *Mycobacterium* spp. e o outro para estoque.

**Figura 7:** Anatomia interna de um peixe mostrando a disposição e nomenclatura dos órgãos.



## 4.5 Isolamento Bacteriano

Foi realizada a identificação bacteriana das colônias isoladas para o diagnóstico de *Francisella* spp. e diferenciais.

### 4.5.1 *Francisella* spp.

Os fragmentos de órgãos (rim, fígado e baço) foram acondicionados em caldo BHI para enriquecimento por 24 horas em temperatura de 37°C para amostras de tilápia e truta. Após esse período, os órgãos em BHI foram macerados e semeados em meio Ágar Mueller Hinton acrescido de cisteína 0,1%, glicose 1% e soro fetal bovino a 3%. Já para o isolamento de *Francisella* spp. de bijupirás foram acrescentados 3% de NaCl ao meio citado acima (HSIEH et al., 2006). Os órgãos foram macerados e desta solução 10 µL foram semeados no ágar e incubados por até 72 horas a 25 e 36°C, respectivamente. Após o período de incubação, havendo proliferação bacteriana neste meio, observaram-se as características morfológicas das colônias como tamanho, forma e coloração. A seguir, foi realizada a bacterioscopia, corando-se pelo método de Gram esfregaços das diferentes colônias, posteriormente observados ao microscópio para identificação da morfologia, disposição das células e características tintoriais ao Gram. As colônias foram identificadas de acordo com Quinn et al. (2005) e Winn et al. (2008) por meio das provas de catalase, oxidase, indol, urease, hidrólise de gelatina, redução de nitrato, Voges-Proskauer, motilidade e fermentação de açúcares.

### 4.5.2 *Mycobacterium* spp.

Para o isolamento do *Mycobacterium* spp. foi utilizada uma metodologia específica para o gênero descrita pelo Manual do CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (1979).

Os fragmentos foram descongelados, macerados e diluídos em solução salina 0,85%, descontaminados pela técnica de Petroff e semeados em meio de cultura Petraghani, com glicerol, fécula de batata, sais e ovos, e adição de verde malaquita para inibir o crescimento de fungos (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979). A incubação foi realizada em duas temperaturas distintas: a 37°C e em temperatura ambiente, para isolamento de micobactérias ambientais. Os cultivos foram observados

semanalmente durante 90 dias e a suspeita do crescimento de *Mycobacterium* spp. indicada pela coloração das colônias: variando da coloração branca, amarelada ao alaranjado (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1979). A confirmação do gênero foi realizada pela técnica de PCR para a região ITS (BORCHARDT, 2009; ROTHET, et al., 2000).

#### 4.6 Histopatologia: Hematoxilina-eosina (H&E) e Ziehl-Neelsen variação Fite-Faraco

As amostras foram processadas no Laboratório Interinstitucional de Sanidade em Aquicultura do Instituto Biológico de São Paulo.

Após a fixação das amostras no formaldeído tamponado a 10%, foi realizado o protocolo de desidratação em série crescente de etanol nas concentrações 70% ao álcool absoluto e diafanização em xilol. Após esse procedimento, os cassetes ficaram submersos em parafina histológica derretida a 52°C, overnight (Quadro 2). Em seguida, os cassetes foram incluídos em parafina em moldes apropriados. As amostras foram seccionadas a 4,5 µm de espessura com auxílio de micrótomo HYRAX M 55Zeiss® (MICHALANY, 1990).

**Quadro 2** - Protocolo para órgãos: desidratação, diafanização e embebição por parafina.

REAGENTES	TEMPO
Álcool 70%	0,5h
Álcool 80%	0,5h
Álcool 95% I	0,5h
Álcool 95% II	0,5h
Álcool Absoluto I	0,5h
Álcool Absoluto II	0,5h
Xilol I	1h
Xilol II	1h
Xilol III	1h
Parafina	<i>overnight</i>

Os cortes foram estendidos em banho-maria (60°C) e colocados em lâmina de vidro tratada previamente com gelatina ultrapura, facilitando a adesão do corte histológico. Em seguida, a lâmina foi incubada em estufa a 52°C, *overnight*, e posteriormente realizada a desparafinização (xilol), seguida de lavagem em álcool

absoluto, hidratação em soluções hidro alcoólicas, coloração pela H&E, desidratação em álcoois e diafanização em xilol modificado segundo Michalany (1990) (Quadro 3). Para a montagem da lâmina e lamínula, foi utilizada a resina sintética Entellan<sup>®</sup> (Merck).

**Quadro 3** - Protocolo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização dos cortes, modificado segundo Michalany (1990).

<b>REAGENTE</b>	<b>TEMPO</b>
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Álcool absoluto	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 80%	2 minutos
Álcool 70%	1 minuto
Água corrente	Imergir rapidamente
Hematoxilina	7 minutos
Diferenciador de Hematoxilina	Imergir rapidamente
Eosina	4 minutos
Água corrente	Imergir rapidamente
Álcool 70%	Imergir rapidamente
Álcool 80%	1 minuto
Álcool 90%	1 minuto
Álcool absoluto I	1 minuto
Álcool absoluto II	1 minuto
Xilol I	1 minuto
Xilol II	1 minuto

Para coloração Ziehl-Neelsen variação Fite-Faraco (Quadro 4), as lâminas passaram por um pré-tratamento por imersão em uma solução contendo 20 mL de Solução de Tris-HCL pH 7,4, 11 mL de Peróxido de Hidrogênio 10% 30V e 69 mL de água destilada por 24 horas ao abrigo da luz, para o branqueamento da melanina dos melanomacrófagos. Após esse período, foi realizado o protocolo de coloração descrito por Fite et al. (1947). Todas as lâminas foram analisadas e microfotografadas em microscópio de luz Carl-Zeiss Axio Scope.A1<sup>®</sup>.

**Quadro 4.** Protocolo de coloração Fite-Faraco (FITE et al., 1947).

<b>REAGENTE</b>	<b>TEMPO</b>
Xilol + vaselina	5 minutos 2x
Secar as lâminas	-
Fucsina de Ziehl-Neelsen	18 minutos

Lavar em água corrente	-
Diferenciador álcool-ácido	1 minuto
Lavar em água corrente	10 minuto
Azul de metileno	1 minuto
Lavar em água corrente	2 minutos
Desidratar, diafanizar e montar.	-

#### 4.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os fragmentos de órgãos foram ressuspensos em solução salina 0,85% e posteriormente extraídos utilizando o protocolo de extração de DNA com o reagente comercial *Quick-gDNA™ MiniPrep Zymo-Spin IIN Columns®* (Zymo Research, Irvine, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

##### 4.7.1 *Francisella* spp.

Após a extração, foi realizada a PCR para detecção da *Francisella* spp. com a utilização de primers descritos por Hsieh et al. (2007): F 5'-GCGGATTAAAGGTGGCCTTTGC-3' e R 5'-CCTGCAAGCTATTA ACTCACAGG-3', com amplificação de um fragmento de 286 pb para o gene rDNA 16S FLB. A amplificação das amostras foi realizada com a utilização de 10 µL de DNA extraído acrescido de 40 µL da mistura de reagentes da PCR contendo 1,25 U Taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, tampão (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM KCl); 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 30 pmol de cada primer. A amplificação da PCR consistiu na denaturação inicial a 94°C por 5 min., seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos e extensão final de 72 °C por 5 minutos em termociclador BioRad®. Para controle positivo da reação foi utilizada cepa de *Francisella* spp., gentilmente cedidas pelo Instituto de Pesca de São Paulo, SP, e água deionizada estéril como controle negativo. Alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 1 µL de corante glicerinado (*Blue juice* – Invitrogen) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, *gel red* (Biotum, USA) 10.000X a 1:125, adicionado de tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X (0,0045 M TRIS-Borato e 1mM de EDTA pH 8,0) respectivamente. A visualização das bandas foi realizada em transluminador de luz ultravioleta.



#### 4.7.2 *Mycobacterium* spp.

Para identificação do DNA do *Mycobacterium* spp. foram utilizadas as amostras isoladas em cultura bacteriana.

As colônias isoladas foram ressuspensas em água ultrapura estéril, acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e fervidas a 100°C por 10 minutos para a inativação, e extração do DNA. Após essa etapa, as amostras foram submetidas ao congelamento à -20°C por no mínimo uma hora (BEMER-MELCHIOR e DRUGEON, 1999).

A padronização da PCR foi realizada utilizando a contaminação experimental de uma cepa de *Mycobacterium fortuitum*, segundo Kantor (1979). Foi realizada a suspensão de *M. fortuitum* na escala 1 de Mac Farland, e dessa, foram realizadas suspensões seriadas na base 10, até a diluição 10<sup>-9</sup>. Foram inoculados 0,1 mL de cada suspensão bacteriana em tubos contendo meio Petraghani, e incubados a 37°C por 30 dias. Após esse período, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

A partir da média aritmética das UFCs nas diluições, foi possível estimar a concentração inicial de 3x10<sup>6</sup> UFC/mL. Dessa, foi retirado 0,1mL e realizada as diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-9</sup> para contaminação experimental de um pool de órgãos de um peixe sabidamente negativo para *Mycobacterium* spp.

Foram testados alguns métodos de extração, e o que apresentou melhor limiar de detecção foi o reagente comercial DNazol (Invitrogen®). A sensibilidade da PCR foi de 3x10<sup>2</sup> UFC/mL com os primers descritos por Roth et al. (2000) e Borchardt (2009), que amplificam fragmentos de 221 pb da região espaçadora intergênica (ITS) compreendida entre 16S - 23S rDNA para o *Mycobacterium* spp.

Posteriormente as amostras foram extraídas utilizando o reagente comercial DNazol (Invitrogen®), de acordo com o fabricante, seguido da PCR convencional.

O DNA extraído dos tecidos e colônia foram submetidos à PCR, utilizando o primer F 5'- ACCTCCTTTCTAAGGAGCACC – 3' (BORCHARDT, 2009) e o primer R 5'- GATGCTCGCAACCACTATCCA – 3' (ROTH et al., 2000), com um produto de 221 pb da região espaçadora (ITS), compreendida entre 16S-23S rDNA, conservada do gênero.

A amplificação da PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguindo-se 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 2 minutos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Depois do último ciclo, foi realizada uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para controle positivo foi utilizada a cepa de *Mycobacterium* spp. que faz parte da coleção do Laboratório de Tuberculose do Instituto Biológico de São Paulo, SP, com a denominação *M. bovis* AN5. E para controle negativo, foi utilizada água deionizada estéril. Alíquotas de 10 µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 1 µL de corante glicerinado (*Blue juice* – Invitrogen) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, *gel red* (*Biotum, USA*) 10.000X a 1:125, adicionado de tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X (0,0045 M TRIS-Borato e 1mM de EDTA pH 8,0) respectivamente. A visualização das bandas foi realizada em transluminador de luz ultravioleta.

#### **4.7.3 Sequenciamento pelo método de SANGER**

O sequenciamento das colônias isoladas de *Mycobacterium* spp. foi realizado com a utilização dos primers forward D1 - 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' e reverse P1 - 5'ACGGTTACCTTGTTACGACTT 3' (WEISBURG, et al., 1991), já para sequenciamento dos produtos de PCR de *Francisella* spp. e *Mycobacterium* spp. foram utilizados os primers descritos nos itens 4.7.1 e 4.7.2.

Após a realização da amplificação, os produtos de PCR foram mantidos a 4°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1× (10,8 g de base tris, 5,5 g de ácido bórico, 4 ml de EDTA 0,5 M e 4 ml de água destilada), corados com *gel red* (*Biotum, USA*) 10.000X a 1:125 e visualizados sob luz ultravioleta. Posteriormente os produtos de PCR foram purificados utilizando o reagente polyethylene glycol (PEG 6000) de acordo com Schmitz e Risner (2006).

Os amplicons foram sequenciados pela metodologia de Sanger em sequenciador capilar *Genetic Analyzer 3500xL* (Applied Biosystems®). Os fragmentos sequenciados foram analisados usando o programa BioEdit (HALL, 1999). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados do GenBank e as que apresentaram as maiores pontuações foram selecionadas e alinhadas

juntamente com as sequências obtidas usando o algoritmo ClustalW. Uma análise filogenética foi realizada usando o programa Mega versão 11 (TAMURA, et al., 2021). A similaridade das sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada usando o *Basic Local Alignment Search Tool* (Blast).

#### **4.8 Preparação do material para Imunohistoquímica e Hibridização *in situ***

Antes das técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ*, foram realizadas a histologia e PCR a fim de estabelecer a presença de granuloma e detectar o DNA de *Francisella* spp. e *Mycobacterium* spp. Para tanto, foram utilizadas duas lâminas silanizadas, para identificação da *Francisella* spp. e outras duas para identificação do *Mycobacterium* spp.

O preparo do material foi semelhante a rotina H&E, sendo os cortes de 4,5 µm de espessura foram estendidos em lâminas silanizadas e os protocolos a seguir foram adaptados de acordo com Cassiano et al. (2017).

As lâminas silanizadas foram desparafinizadas com xilol e reidratadas em sequência decrescente de álcoois (absoluto, 95°, 80° e 70°) e água destilada, submersas em uma solução contendo 20 mL de Solução de tris-HCL pH 7,4, 11 mL de peróxido de hidrogênio 10% 30V e 69 mL de água destilada por 24 horas ao abrigo da luz, para o branqueamento da melanina dos melanomacrófagos (KORYTOWSKI e SARNA, 1990).

##### **4.8.1 Imunohistoquímica**

Com as lâminas silanizadas foi realizado o protocolo de recuperação antigênica, aplicando 100µL de Proteinase K (Dako – S3020) por corte e, por 5 minutos, em temperatura ambiente, seguido de lavagem com água destilada. Após essa etapa, com a finalidade de diminuir as ligações inespecíficas, foi realizado o tratamento das lâminas com leite desnatado Molico® na concentração de 5% durante em água durante 60 minutos à temperatura ambiente. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 10 volumes a 3% em água destilada, por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e depois em tampão

fosfato (PBS 0,1 M). Após foi realizada a secagem dos cortes para a aplicação do anticorpo.

Após o preparo das lâminas descritas acima procedeu-se a identificação de *Francisella* spp. e de *Mycobacterium* spp. com anticorpos policlonais anti-*Francisella* (1:500) (*Imuny Biotechnology*®) e anti-*Mycobacterium* (1:500) (*Imuny Biotechnology*®), ambos diluídos em redutor de fundo Dako (Cód. S3022), e cada lâmina foi incubada em câmara úmida refrigerada de 2- 8°C, por 18 horas.

Após incubação, foram realizadas duas lavagens com tampão fosfato (PBS 0,1M) em temperatura ambiente por 1 minuto. A revelação através do uso de conjugado ocorreu com a utilização os reagentes *LSAB*®+ *System-HRP* (Dako – cód. K0690) adaptado do protocolo sugerido pelo fabricante. O tempo de incubação foi de 20 minutos à temperatura ambiente para cada um dos reagentes, intercalados com duas lavagens com tampão fosfato (PBS 0,1M) por 1 minuto.

Após essa etapa, as lâminas foram submetidas ao sistema de substrato-cromógeno *Liquid DAB+ Substrat Chromogen System* (Dako® – cód. K3468), revelando a marcação do anticorpo por 5 minutos em temperatura ambiente, seguido de lavagem em água destilada e água corrente e, a contra-coloração foi com hematoxilina de Harris por 5 minutos.

#### **4.8.2 Hibridização *in situ***

Com as lâminas silanizadas, foi realizado o protocolo de recuperação antigênica, aplicando tampão diluído (Dako® S1699) em banho maria a 96°C, por 40 min. Após resfriamento completo das lâminas, foi realizado o bloqueio com peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio 10V a 3% em metanol), por 20 min em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a digestão enzimática dos tecidos com proteinase K (Dako®) por 5 min., à temperatura ambiente.

Para identificação do DNA bacteriano foram utilizadas as sondas biotiniladas específicas: para *Francisella* spp. (HSIEH et al., 2007) com as sondas: F 5'-GCGGATTAAAGGTGGCCTTTGC-3' e R 5'-CCTGCAAGCTATTA ACTCACAGG-3', e para detecção do *Mycobacterium* spp. (BORCHARDT, 2009; ROTH et al., 2000)

com as sondas: F 5'- ACCTCCTTTCTAAGGAGCACC – 3' e R 5'- GATGCTCGC AACCACTATCCA – 3', misturados a um tampão de diluição fornecido no kit (Dako<sup>®</sup> – kit cód. K0620). Os tecidos foram submersos em solução com sonda e tampão de diluição, depois foram cobertos por uma lamínula. As lâminas montadas foram colocadas no hibridizador Dako<sup>®</sup> (desnaturação a 96°C e hibridização a 37°C) overnight (18h).

Após este período, foi realizado o banho de estringência em banho maria a 45°C, por 30 minutos em tampão fornecido pelo kit e lavagem com TBST (Tris tamponado salina/Tween a 3%). O sistema de revelação utilizado foi estreptavidina primária em tampão diluente por 30 minutos, em câmara úmida, depois o reagente biotínil tiramida por 15 min., em temperatura ambiente e por fim, a estreptavidina secundária por 15 min. (Dako<sup>®</sup> – kit cód. K0620).

Intercalando-se a cada etapa descrita acima, foram realizadas duas lavagens com tampão TBST por 5 minutos. O sistema de substrato-cromógeno utilizado foi o *Liquid DAB+ Substrat Chromogen System* (Dako<sup>®</sup> – cód. K3468), com incubação de 5 minutos em temperatura ambiente, seguido de lavagem em água destilada e água corrente. A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 5 minutos.

#### **4.9 Análise estatística**

Os resultados foram analisados com o “teste de comparação de duas proporções com distribuição amostral de Bernoulli” (MOOD et al., 1974). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 5.

#### **4.10 Análise de grau de concordância – Kappa**

O índice de concordância *Kappa* foi utilizado entre as provas diagnósticas utilizando o programa estatístico IBM SPSS Statistics (TANG et al., 2015) com nível de confiança de 95%. O grau de concordância das margens dos valores do índice *Kappa* podem ser consultados no quadro 5.

Quadro 5 – Margens de valores para classificar o grau de concordância do índice *Kappa*.

<b><i>Kappa</i></b>	<b>Grau de concordância</b>
< 0	ausente
0 - 0,2	insignificante
0,2 - 0,4	baixo
0,4 - 0,6	moderado
0,6 - 0,8	bom
0,8 - 1	muito bom

## 5. RESULTADOS

Os resultados foram descritos por etapa e posteriormente foram realizadas as análises comparativa e estatística entre as técnicas utilizadas no presente estudo.

### 5.1. Biometria dos animais

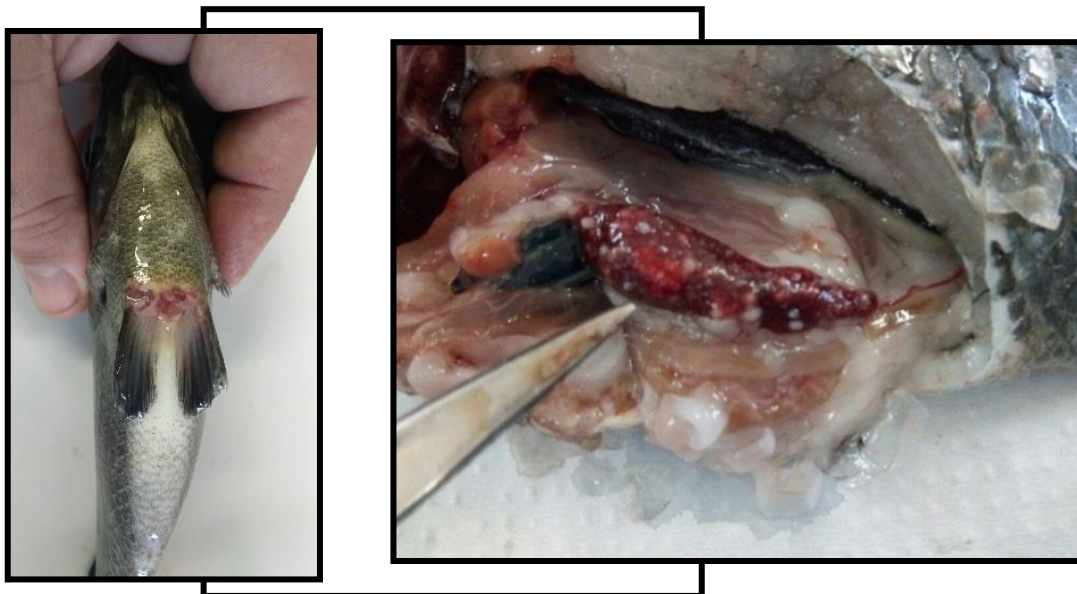
Após a coleta e a anestesia os animais foram pesados e medidos para realização da biometria como descrito na tabela abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Biometria dos animais por piscicultura.

	<b>nº de peixes</b>	<b>Peso médio (g)</b>	<b>Comprimento (cm)</b>
<b>Piscicultura A1</b>	20	105,0g ± 8,5g	17,5cm ± 1,1cm
<b>Piscicultura A2</b>	10	140,0g ± 5,7g	18,4cm ± 0,8cm
<b>Piscicultura A3</b>	10	79,6g ± 12,7g	16,1cm ± 0,7cm
<b>Piscicultura A4</b>	10	139,8g ± 147,1g	17,6cm ± 7,1cm
<b>Piscicultura A5</b>	10	8,4g ± 4,6g	7,7cm ± 1,6cm
<b>Piscicultura B</b>	20	25,5g ± 3,2g	16,7cm ± 0,6cm
<b>Piscicultura C</b>	20	445,5g ± 1766,1g (EP 394,92)	39,4cm ± 26,5cm
<b>Piscicultura D1</b>	12	266,1g ± 195,8g (EP 43,78)	24,7cm ± 6,6cm
<b>Piscicultura D2</b>	11	102,1g ± 37,4g	17,3cm ± 3,2cm
<b>Piscicultura E</b>	5	994,84g ± 258,02g	39,2cm ± 1,76cm

### 5.2. Análise macroscópica

Foram coletados 128 animais, sendo: 83 tilápias, 40 bijupirás e 5 trutas. Desses, 18 animais apresentaram lesões branca-acinzentadas semelhante aos nódulos de Ghon (Figura 8 e 9), com aspecto caseoso, circunscritos, firmes e de quantidade variadas. Esse tipo de lesão foi observado em vários peixes, sendo mais frequente em baço (10/18), rim (4/18) e fígado (4/18). Esse resultado sugere tropismo dos agentes por regiões esplênicas. Além da lesão granulomatosa descrita acima, foram observadas diversas outras lesões ulcerativas em nadadeiras peitorais e dorsais, além de fígado hemorrágico, dois animais com má formação (Figura 10) e dois peixes com exoftalmia.



**Figura 8** – A. Lesões ulceradas na nadadeira peitoral em tilápia-do-Nilo capturada na piscicultura de Santa Fé do Sul/SP. B. Presença de granulomas no baço com esplenomegalia (ponta da tesoura), na mesma tilápia-do-Nilo após incisão da região ventral.



**Figura 9** - Presença de granulomas no rim encefálico (ponta da tesoura) e no fígado (seta preta) em tilápia-do-Nilo capturada em uma piscicultura de Santa Fé do Sul/SP.



**Figura 10**- Má formação dorsal em tilápia-do-Nilo, capturada em uma piscicultura de Santa Fé do Sul/SP.

### 5.3. Isolamento Bacteriano

O isolamento bacteriano da *Francisella* spp. e do *Mycobacterium* spp. foram realizados no Laboratório de Bacteriologia Geral e Tuberculose do Centro de Pesquisa em Sanidade Animal do Instituto Biológico, SP.



### 5.3.1. *Francisella* spp.

No isolamento bacteriano para o diagnóstico de *Francisella* spp., nenhuma amostra foi positiva. Entretanto, foram isolados e identificados diversos outros gêneros bacterianos nas amostras, conforme Tabela 2.

**Tabela 2.** Caracterização bioquímica dos gêneros e espécies bacterianas isoladas em tilápias (83), bijupirás (40) e trutas (5).

	TILÁPIA (n/%)	BIJUPIRÁ (n/%)	TRUTAS (n/%)
Enterobactéria	19 / 22,89%	27 / 67,5%	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	26 / 31,32 %	23 / 57,5%	2 / 40%
<i>Bacillus</i> spp.	36 / 43,37%	20 / 50%	3 / 60%
Cocobacilo Gram negativo não fermentador móvel oxidase positiva	2 / 2,40%	0	0
Cocobacilo Gram negativo não fermentador móvel oxidase negativa	1 / 1,20%	0	0
Bacilo Gram negativo não fermentador imóvel oxidase positiva	1 / 1,20%	0	0
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	16 / 19,44%	0	0
<i>Aeromonas jandaei</i>	1 / 1,20%	0	0
<i>Aeromonas eucrenophila</i>	1 / 1,20%	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2 / 2,40%	0	0
<i>Lactococcus garvieae</i>	0	0	1 / 20%
<i>Lactococcus lactis</i>	3 / 3,61%	0	2 / 40%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 / 1,20%	0	0
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	0	0	1 / 20%
<i>Cronobacter</i> spp.	1 / 1,20%	0	0
<i>Streptococcus</i> spp.	1 / 1,20%	0	0
<i>Pasteurella aerogenes</i>	0	2 / 5%	0
Ausência de crescimento	35 / 42,16%	16 / 40%	0
Contaminação por <i>Proteus</i> sp.	0	1 / 2,5%	0

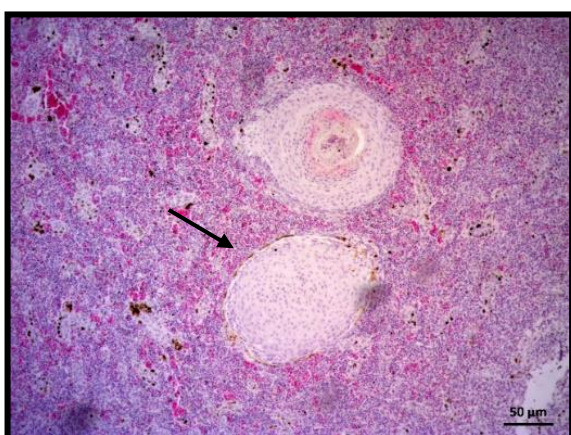
### 5.3.2. *Mycobacterium* spp.

No isolamento do *Mycobacterium* spp., foram obtidas colônias suspeitas em amostras de tilápias em 9,6% (8/83) nas pisciculturas A1, A3, A4, A5, D1 e D2. Nas amostras de bijupirás (pisciculturas B e C) e nas trutas (piscicultura E) os resultados foram negativos para isolamento.

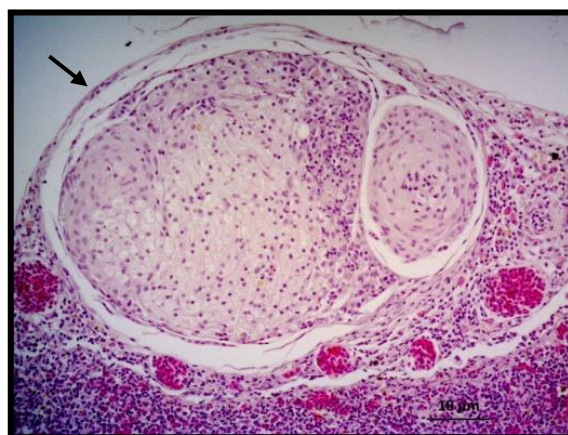
Para a identificação molecular das oito colônias isoladas suspeitas, foi realizado a PCR para *Mycobacterium* spp. com primers específicos para esse gênero, confirmando em todas o gênero *Mycobacterium* spp.

#### 5.4. Histopatologia: Hematoxilina-eosina (H&E) e Ziehl-Neelsen variação Fite-Faraco

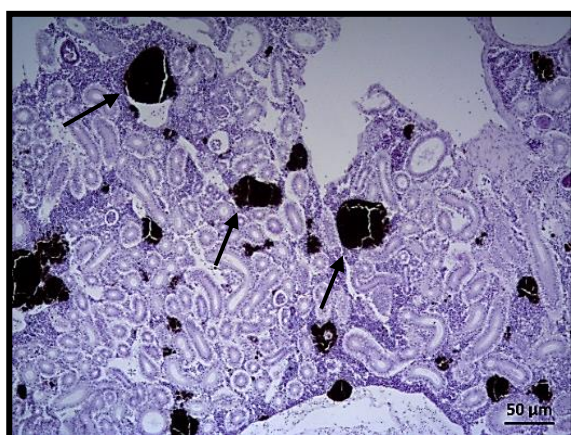
Dos 128 animais coletados, foi verificada a presença de reação inflamatória granulomatosa (Figuras 11 e 12), caseosas em alguns casos e não-caseosas em outros, em 59 animais, pela técnica de H&E. Além disso, observa-se, ao redor da lesão granulomatosa, ou granuloma, macrófagos, células epiteliais e células inflamatórias mononucleares, especialmente linfócitos e alguns plasmócitos. Nota-se também centros de melanomacrófagos (Figuras 13 e 14) e fibroblastos os quais produzem progressivamente as fibras de colágeno formando uma cápsula ao redor do granuloma.



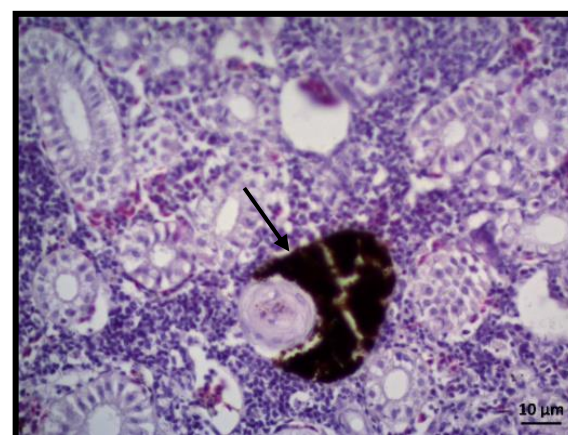
**Figura 11** - Fotomicrografia sugestiva do granuloma no baço de Bijupirá proveniente da piscicultura C (seta preta). (Aumento 100X).



**Figura 12** - Fotomicrografia sugestiva do granuloma no baço de Tilápia proveniente da piscicultura A1 (seta preta). (Aumento 400X).



**Figura 13** - Fotomicrografia sugestiva de inúmeros centros de melanomacrófagos no rim de Bijupirá proveniente da piscicultura B (seta preta) (aumento 100X).



**Figura 14** - Fotomicrografia sugestiva dos melanomacrófagos em fagocitose do granuloma no rim Bijupirá proveniente da piscicultura C (seta preta) (aumento 400X).

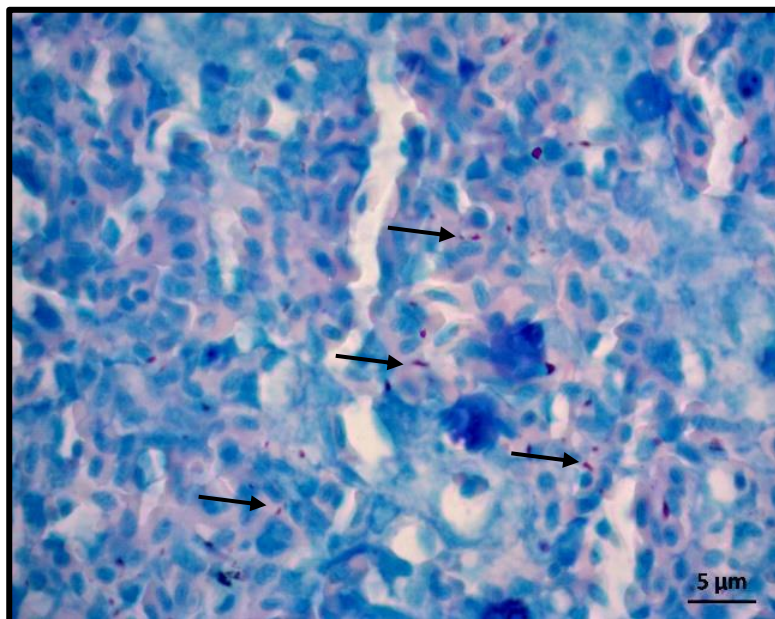
Foi observada também intensa infiltração de melanomacrófagos, eosinófilos no parênquima tecidual do baço, rim, hepatopâncreas e arco branquial. Embora, a presença dessas células inflamatórias possa estar relacionada com diferentes lesões patológicas, como, a presença de parasitas, detoxificação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos, sugere-se que estas estejam interligadas com a lesão granulomatosa. Nota-se também que diversos peixes apresentaram outras alterações histopatológicas como por exemplo: hemorragia no baço, rim e hepatopâncreas, entre outras, como descritos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Achados histopatológicos no rim, baço, hepatopâncreas e arco branquial

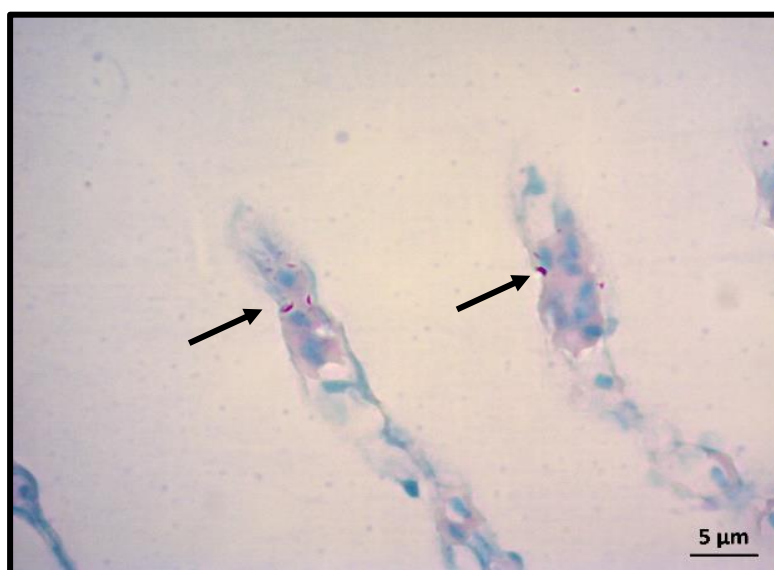
<b>BAÇO</b>			
	<b>TILÁPIA (n=83)</b>	<b>BIJUPIRÁ (n=40)</b>	<b>TRUTA (n=5)</b>
hemorragia	36,1% (30/83)	42,5% (17/40)	80% (4/5)
presença de melanomacrófago	83,1% (69/83)	87,5% (35/40)	80% (4/5)
vasos congestionados	40,9% (34/83)	45% (18/40)	0
presença de eosinófilos	25,3% (21/83)	0	0
hiperplasia linfocitária	22,8% (19/83)	7,5% (3/40)	40% (2/5)
SAP	1,2% (1/83)	0	0
<b>granuloma</b>	36% (30/83)	5% (2/40)	0
<b>RIM</b>			
	<b>TILÁPIA (n=83)</b>	<b>BIJUPIRÁ (n=40)</b>	<b>TRUTA (n=5)</b>
hemorragia	63,8% (53/83)	77,5% (31/40)	100% (5/5)
presença de melanomacrófago	37% (31/83)	90% (36/40)	100% (5/5)
vasos congestionados	22,8% (19/83)	45% (18/40)	40% (2/5)
presença de eosinófilos	55,4% (46/83)	60% (24/40)	0
tubuloglomerulonefrite monolinfocitária	34,9% (29/83)	92,5% (37/40)	60% (3/5)
tubulonefrose	12% (10/83)	70% (28/40)	100% (5/5)
aumento do espaço de Bowman	16,8% (14/83)	75% (30/40)	80% (4/5)
necrose	14,4% (12/83)	12,5% (5/40)	40% (2/5)
calcificação distrófica	21,6% (18/83)	30% (12/40)	0
SAP	3,6% (3/83)	0	0
<b>granuloma</b>	28,9% (24/83)	35% (14/40)	0
<b>HEPATOPÂNCREAS</b>			
	<b>TILÁPIA (n=83)</b>	<b>BIJUPIRÁ (n=40)</b>	<b>TRUTA (n=5)</b>
hemorragia	8,4% (7/83)	52,5% (21/40)	60% (3/5)
presença de melanomacrófago	27,7% (23/83)	15% (6/40)	20% (1/5)
vasos congestionados	44,5% (37/83)	72,5% (29/40)	20% (1/5)
presença de eosinófilos	67,4% (56/83)	50% (20/40)	0
rarefação citoplasmática	46,9% (39/83)	2,5% (1/40)	0
necrose	6% (6/83)	15% (6/40)	0
hialinização	3,6% (3/83)	5% (2/40)	40% (2/5)
hepatite monolinfocitária	25,3% (21/83)	65% (26/40)	40% (2/5)
esteatose	0	45% (18/40)	20% (1/5)
SAP	15,6% (13/83)	0	0
<b>granuloma</b>	9,6% (8/83)	15% (6/40)	20% (1/5)
<b>ARCO BRANQUIAL</b>			
	<b>TILÁPIA (n=83)</b>	<b>BIJUPIRÁ (n=40)</b>	<b>TRUTA (n=5)</b>
presença de melanomacrófago	7,2% (6/83)	5% (2/40)	60% (3/5)
vasos congestionados	22,8% (19/83)	5% (2/40)	0
presença de eosinófilos	73,4% (61/83)	0	20% (1/5)
edema	37,3% (31/83)	12,5% (5/40)	0
perda das lamelas	26,5% (22/83)	0	0
fusão das lamelas	44,5% (37/83)	2,5% (1/40)	40% (2/5)
má formação	0	2,5% (1/40)	40% (2/5)
SAP	8,4% (7/83)	70% (28/40)	0
<b>granuloma</b>	0	2,5% (1/40)	0

\*SAP: Sem alterações histopatológicas

Com a utilização da técnica Fite-Faraco, as amostras das Pisciculturas de tilápias-do-Nilo obtiveram visualização positiva em 51,8% (43/83) de bacilos álcool-ácido resistentes sugestivos de *Mycobacterium* spp., enquanto nas amostras das pisciculturas de bijupirás, foram observados 45% (18/40) a presença desses bacilos (Figuras 15 e 16). Não foram observados os bacilos nas trutas.



**Figura 15** -Fotomicrografia sugestiva dos bacilos álcool-ácidos resistentes corados pela técnica Fite Faraco no baço de uma Tilápia proveniente da piscicultura D1 (seta preta) (aumento 1000X).

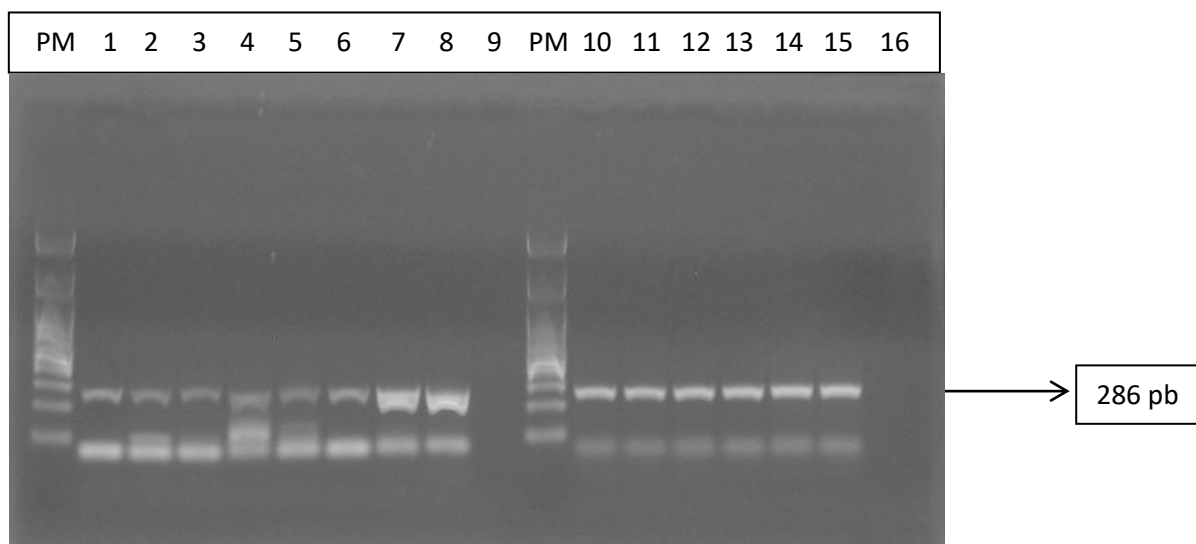


**Figura 16** -Fotomicrografia sugestiva dos bacilos álcool-ácidos resistentes corados pela técnica Fite Faraco nas lamelas do arco branquial de Bijupirá proveniente da piscicultura C (seta preta) (aumento 1000X).

## 5.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

### 5.5.1. PCR para detecção da *Francisella* spp.

Das 128 amostras coletadas e extraídas, 21,6% (18/83) foram positivas nas pisciculturas A1, A3, A4 e D1 (tilápias) e 47,5% (19/40) positivas nas amostras pisciculturas B e C (bijupirás). Nas cinco amostras coletadas da piscicultura E (trutas) não se obteve amostras positivas (Figura 17).



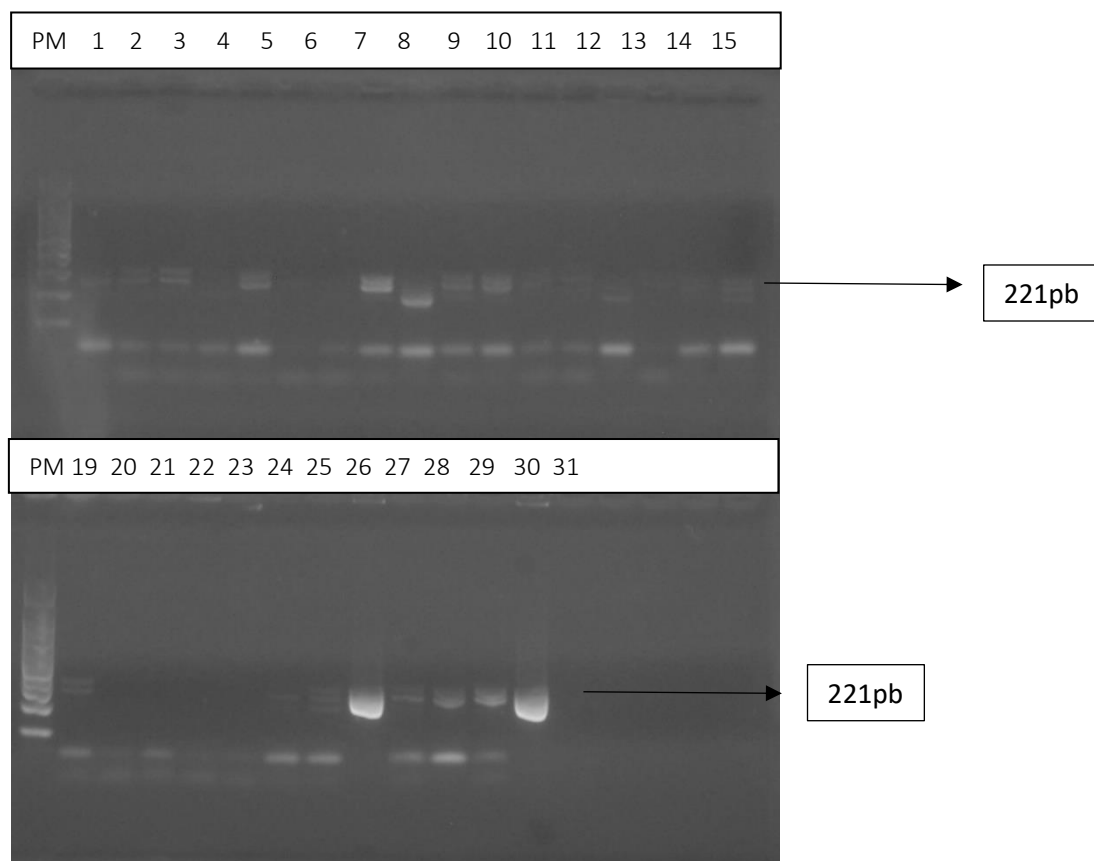
**Figura 17** – Resultado da eletroforese em gel de agarose (1,5 %) dos produtos de DNA amplificados por PCR a partir de amostras de DNA extraídas de espécimes de bijupirá de duas pisciculturas (A1, A5, B e C) localizadas no Estado de São Paulo, Brasil. Para as ampliações dos produtos de DNA, com tamanho esperado de 286 pares de bases (pb), empregaram-se pares de primers específicos para *Francisella* spp.

**PM:** Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen®); **1, 2 e 3:** peixes da piscicultura A1; **4, 5 e 6:** peixes da piscicultura A5; **7 e 8:** controles positivos; **10, 11 e 12:** peixes da piscicultura B; **13, 14 e 15:** peixes da piscicultura C; **9 e 16:** controle negativo.

### 5.5.2. PCR para detecção do *Mycobacterium* spp.

Após a padronização da extração de DNA de pool de órgãos (fígado, baço e rim) com o reagente comercial DNAzol, de acordo com o fabricante, 9,6% (8/83) em tilápias-do-Nilo, 57,5% (23/40) em bijupirás e 20% (1/5) em trutas foram positivas.

Após a realização da eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas, algumas apresentaram mais de uma banda na altura de 221 pb (tamanho da banda esperada) como pode-se visualizar na figura abaixo (Figura 18), portanto, três dessas amostras foram sequenciadas pelo método de SANGER. Na análise das sequências obtidas, notou-se a sobreposição de duas ou mais bandas de micobactérias na mesma amostra, não sendo possível determinar todas as possíveis micobactérias que estão presentes nas amostras do presente trabalho.



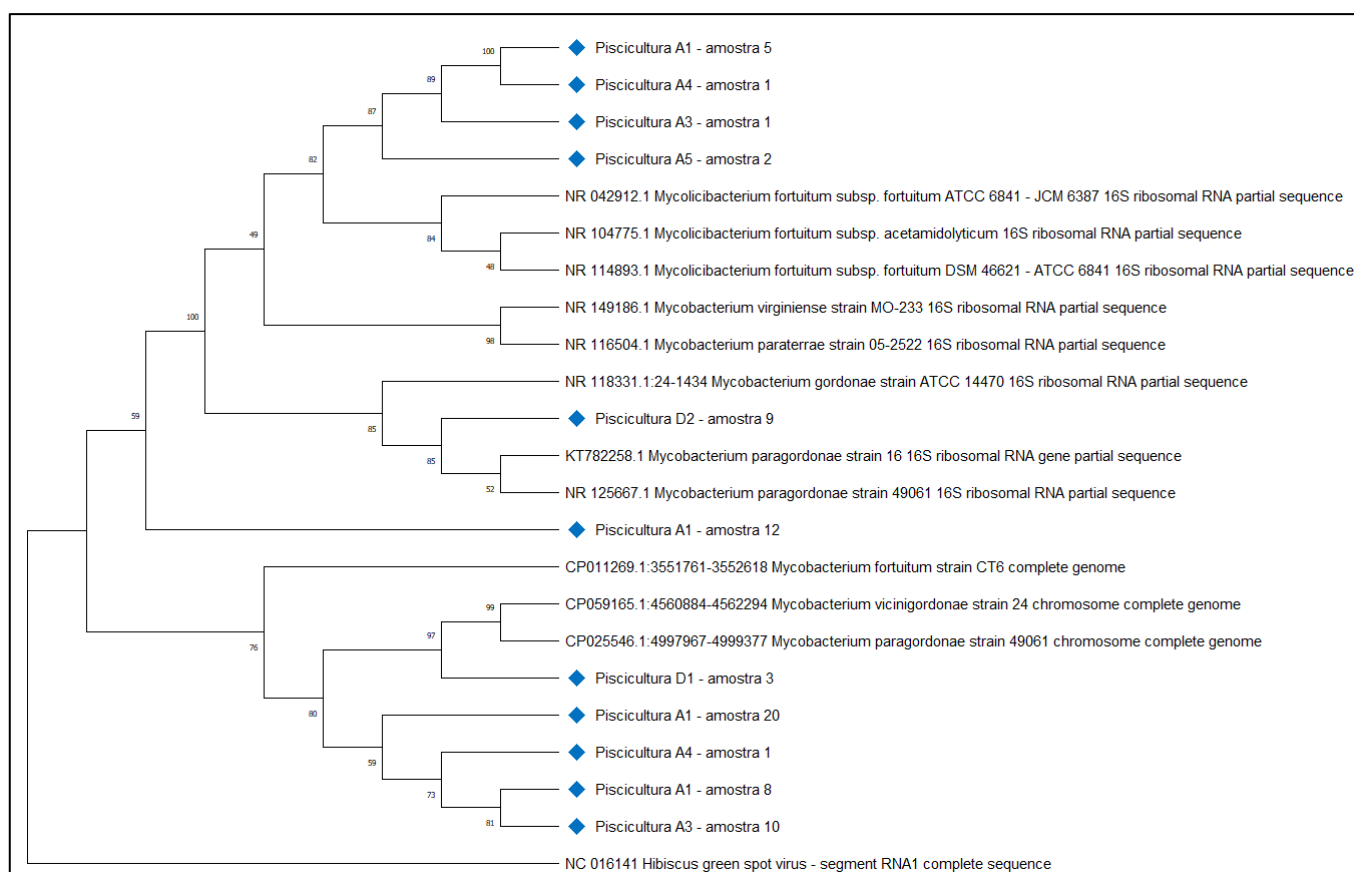
**Figura 18** - Resultado da eletroforese em gel de agarose (1,5 %) dos produtos de DNA amplificados por PCR para amplificação de fragmento da região ITS de *Mycobacterium* spp. a partir do DNA extraído. **PM:** Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen®); **1 a 25, 27, 28 e 29:** amostras de DNA extraído; **26 e 30:** controles positivos (*M. fortuitum*). **31:** controle negativo.

## 5.6. Sequenciamento pelo método de SANGER

### 5.6.1. Sequenciamento colônias isoladas *Mycobacterium* spp.

Das 128 amostras, 11 foram positivas no cultivo microbiológico para *Mycobacterium* spp., e foi realizado o sequenciamento pelo método de SANGER com a utilização de primers que amplificam a região 16S ribossomal, descritos por Weisburg et al. (1991).

Foram sequenciadas e confirmadas as espécies: *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium paragordonae*, como demonstrado na árvore filogenética (Figura 19).

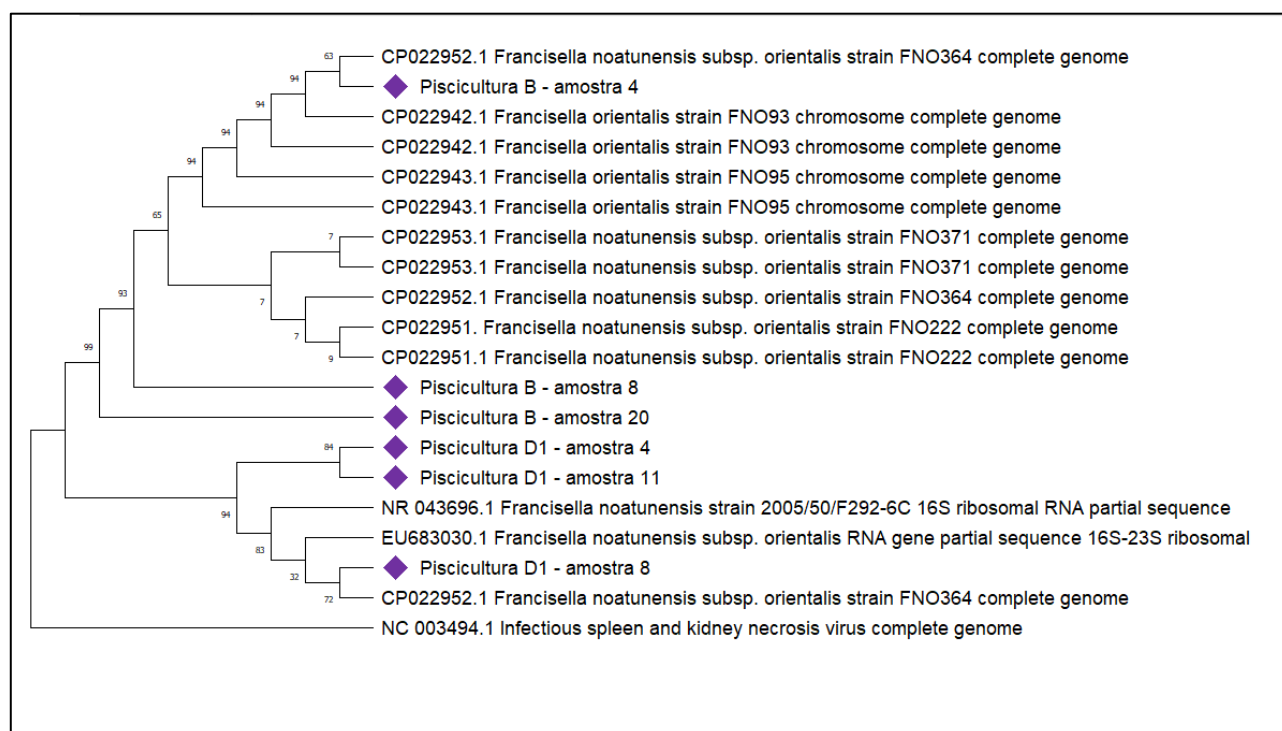


**Figura 19.** Árvore filogenética dos isolados de *Mycobacterium* spp. Produto de amplificação por PCR convencional a partir de colônias isoladas e sequenciados pelo método de SANGER demonstradas pelos losangos em destaque.

A árvore foi enraizada usando o vírus HGSV-2 (Hibiscus green spot vírus) da família Rhabdoviridae como grupo externo. Análise evolutiva foi feita pelo método de máxima verossimilhança e o modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HASEGAWA, et al., 1985). A árvore inicial para a busca heurística foi obtida automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando a abordagem Maximum Composite Likelihood (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de probabilidade logarítmico superior. Esta análise envolveu 23 sequências de nucleotídeos. Havia um total de 9976 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA11 (TAMURA, et al., 2021). Foram utilizados os valores de suporte de *bootstrap* (500 repetições) de ramificações superiores a 60%.

### 5.6.2. Sequenciamento amostras positivas na PCR para *Francisella* spp.

Das 37 amostras que foram positivas na PCR para a *Francisella* spp., foi realizado o sequenciamento pelo método de SANGER de 6 amostras (3 amostras de tilápia e 3 amostras de bijupirás), com resultado em todas as amostras como pertencente a *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, e posteriormente foi realizada a construção da árvore filogenética (Figura 20).





**Figura 20.** Árvore filogenética da espécie *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. Produto de amplificação por PCR convencional de amostra clínica e sequenciados pelo método de SANGER demonstradas pelos losangos em destaque.

A árvore foi enraizada usando vírus ISKNV da família Iridoviridae como grupo externo. Análise evolutiva foi feita pelo método de máxima verossimilhança. A história evolutiva foi inferida usando o método da máxima verossimilhança e o modelo Kimura de 2 parâmetros (KIMURA, 1980). A porcentagem de árvores nas quais os táxons associados se agruparam é mostrada ao lado dos ramos. Esta análise envolveu 20 sequências de nucleotídeos. Havia um total de 243 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA11 (TAMURA, et al., 2021). Foram utilizados os valores de suporte de *bootstrap* (500 repetições) de ramificações superiores a 60%.

### 5.7. Imunohistoquímica e hibridização *in situ*

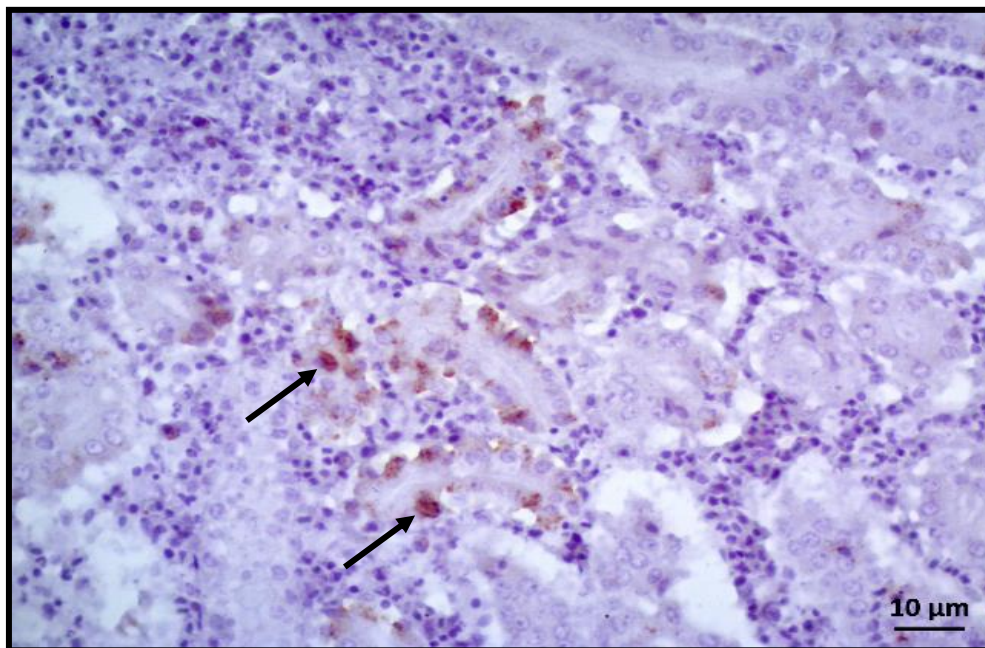
As amostras que apresentaram granulomas na histopatologia e amplificação na PCR, foram processadas para as técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ*.

#### 5.7.1. Imunohistoquímica

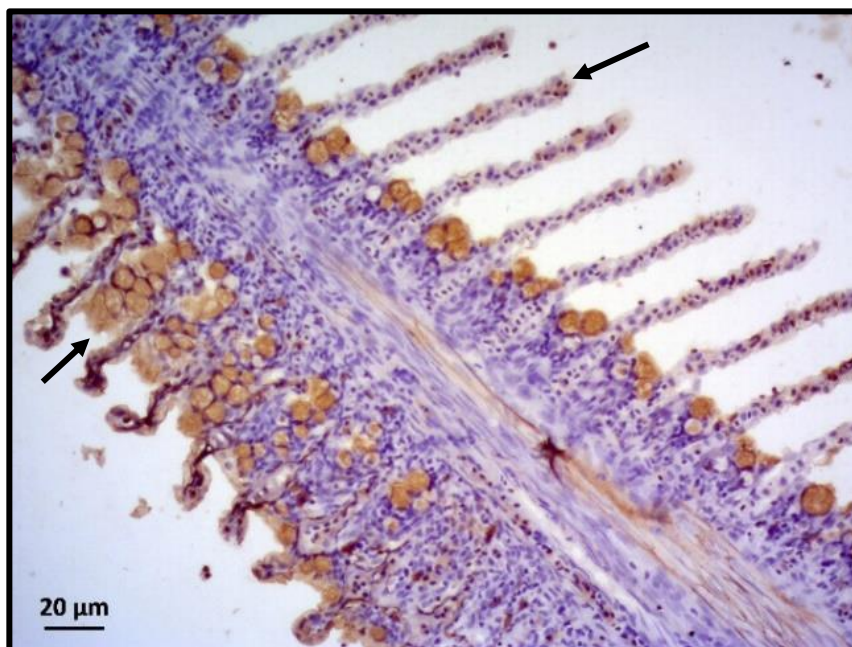
Na imunohistoquímica, foram identificadas marcações positivas para *Francisella* spp., e *Mycobacterium* spp., em 48,4% (62/128) (Figura 21 e 22), e 61,7% (79/128), respectivamente (Figura 23) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Marcações positivas para *Mycobacterium* spp. e *Francisella* spp. através da técnica de imunohistoquímica por espécie de peixe e piscicultura.

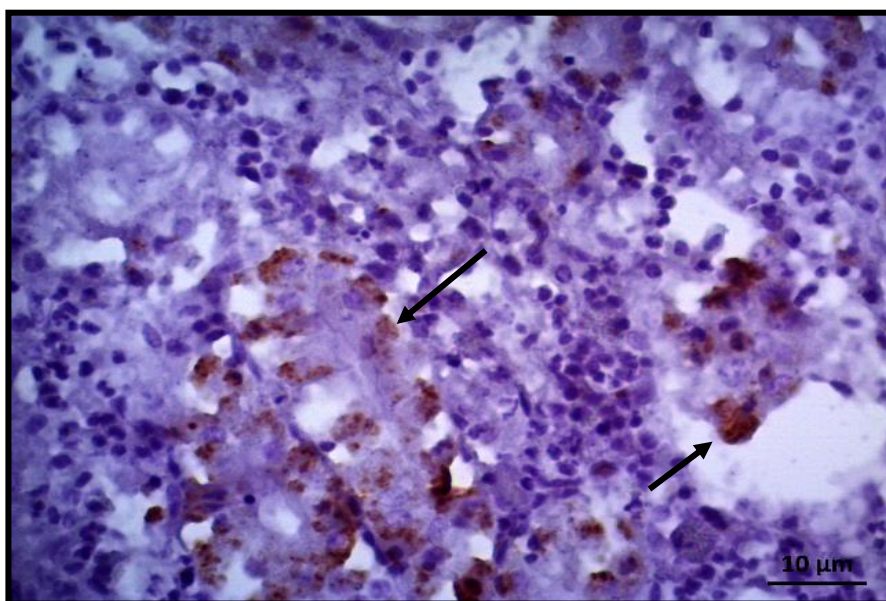
		Nº marcações positivas / Nº total		
		Piscicultura	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Francisella</i> spp.
IMUNOHISTOQUÍMICA	TILÁPIA	A1	8 / 20	7 / 20
		A2	6 / 10	4 / 10
		A3	8 / 10	5 / 10
		A4	3 / 10	2 / 10
		A5	5 / 10	5 / 10
	BIJUPIRÁ	D1	12 / 12	11 / 12
		D2	9 / 11	9 / 11
	TRUTA	B	14 / 20	7 / 20
		C	14 / 20	12 / 20
		E	0 / 5	0 / 5



**Figura 21**– Fotomicrografia de imunohistoquímica positiva para *Francisella* spp. no rim (seta preta) (aumento 400X).



**Figura 22** - Fotomicrografia de imunohistoquímica positiva para *Francisella* spp. no arco branquial (seta preta) (aumento 200X).



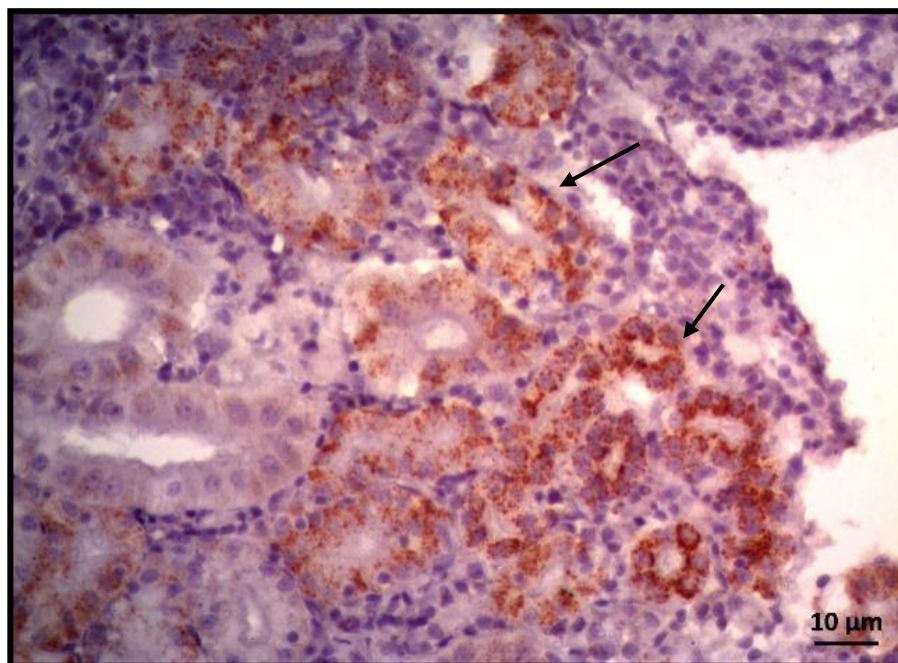
**Figura 23** - Fotomicrografia de imunohistoquímica positiva para *Mycobacterium* spp. no rim (seta preta) (aumento 630X).

### 5.7.2. Hibridização *in situ*

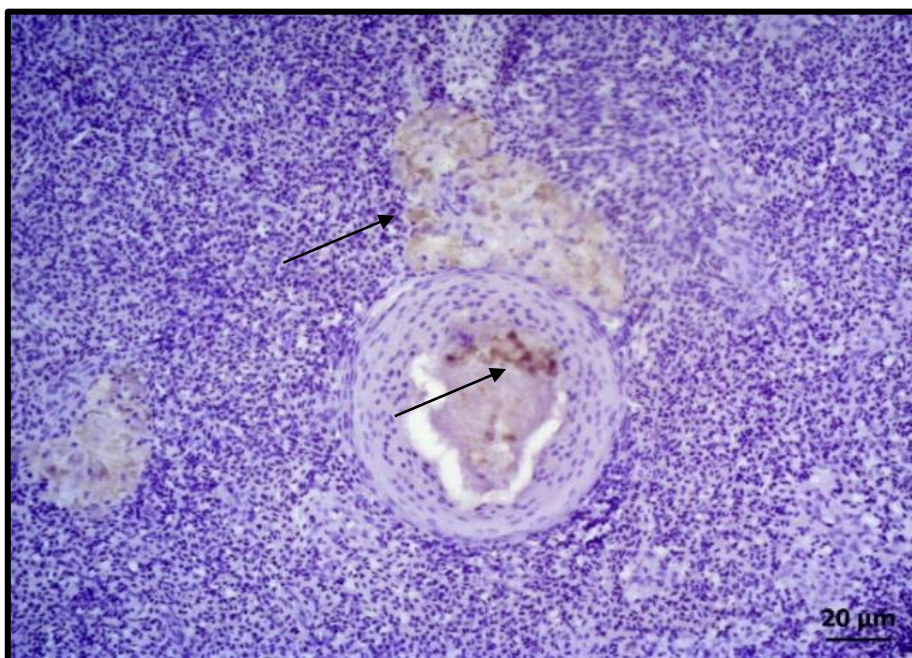
Com a hibridização *in situ*, 52,3% (67/128) apresentaram marcações positivas para *Francisella* spp. (Figura 24 e 25) e 57% (73/128) para *Mycobacterium* spp. (Figura 26) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Resultados das marcações positivas para *Mycobacterium* spp. e *Francisella* spp. através da técnica de hibridização *in situ* por espécie de peixe e piscicultura.

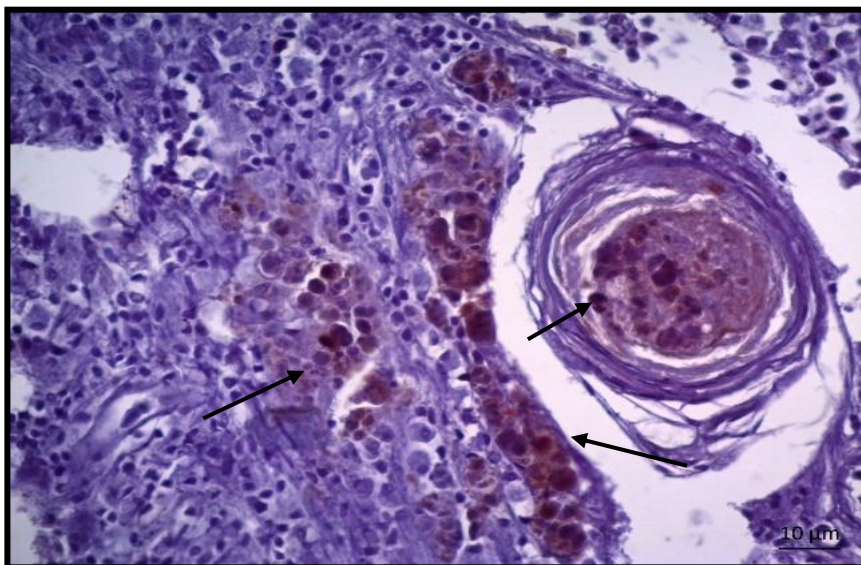
		Nº marcações positivas / Nº total		
		Piscicultura		
		<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Francisella</i> spp.	
HIBRIDIZAÇÃO <i>in situ</i>	TILÁPIA	A1	8 / 20	6 / 20
		A2	6 / 10	5 / 10
		A3	8 / 10	5 / 10
		A4	3 / 10	2 / 10
		A5	5 / 10	4 / 10
	BIJUPIRÁ	D1	11 / 12	12 / 12
		D2	8 / 11	9 / 11
	TRUTA	B	10 / 20	13 / 20
		C	14 / 20	11 / 20
		E	0 / 5	0 / 5



**Figura 24** – Fotomicrografia de hibridização *in situ* positiva em marrom para *Francisella* spp. no rim (seta preta). (Aumento 400X).



**Figura 25** – Fotomicrografia de hibridização *in situ* positiva em marrom para *Francisella* spp. em um granuloma no baço (seta preta). (Aumento 200X).



**Figura 26** – Fotomicrografia de hibridização *in situ* positiva em marrom para *Mycobacterium* spp. em um granuloma no rim (seta preta). (Aumento 400X).

## 5.8. Análise estatística

Para comparar os resultados das diferentes técnicas de diagnósticos, foram utilizados os valores percentuais de presença ou ausência dos microrganismos. Por ser uma distribuição amostral de cunho dicotômico, as amostras não apresentaram variabilidade e, por isso, optamos pelo cálculo de “Teste para comparação de duas proporções com distribuição de Bernoulli” (MOOD et al., 1974).

### 5.8.1. Análise comparativa das técnicas de diagnóstico para *Francisella* spp.

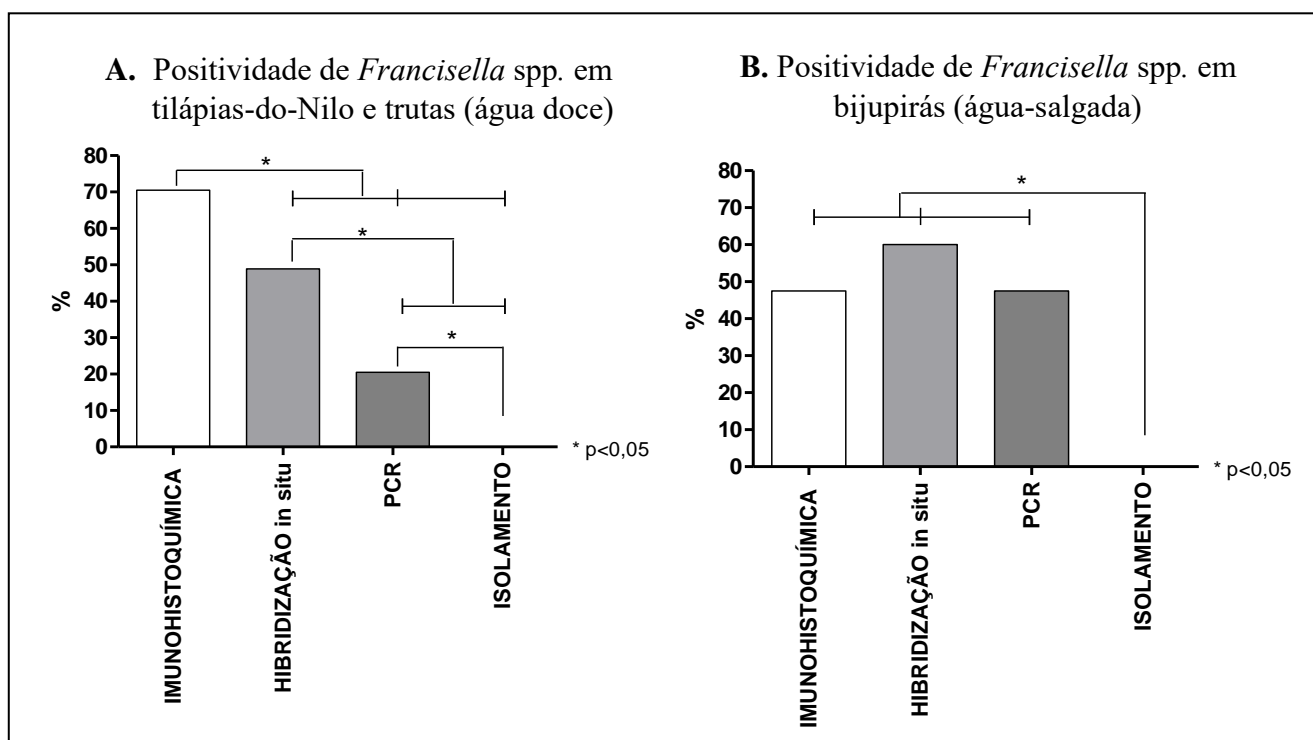
A análise comparativa entre as técnicas isolamento bacteriano, PCR, imunohistoquímica e hibridização *in situ* realizadas nas amostras coletadas de tilápias-do-Nilo e trutas (água-doce) e bijupirás (água-salgada), indica a relação de amostras positivas e a porcentagem de detecção da bactéria em cada uma das técnicas em relação ao número amostral.

Para os peixes de água doce, foi observado que as técnicas imunohistoquímica, hibridização *in situ*, e PCR apresentaram uma positividade significativa, quando comparadas com a técnica de isolamento. Além disso, as técnicas de imunohistoquímica

e hibridização *in situ* apresentaram uma positividade significativa quando comparadas com a técnica de PCR. Ademais, foi observado que a técnica de imunohistoquímica apresentou uma positividade maior quando comparada com a técnica de hibridização *in situ*.

Já a análise estatística realizada para os peixes de água salgada, foi observado que as técnicas de imunohistoquímica, hibridização *in situ* e PCR apresentaram uma positividade significativa, quando comparadas com a técnica de isolamento. Porém, não foi identificada diferença estatística entre as técnicas de imunohistoquímica, hibridização *in situ*, e PCR.

Foi utilizado o teste para identificação de duas proporções independentes e foi considerado  $p < 0,05$  quando o z-score da análise foi menor que -1,96 ou maior que 1,96 (Figura 27).



**Figura 27.** Identificação de *Francisella* spp. em tilápia-do-Nilo e trutas (água-doce) e bijupirás (água-salgada). **A.** Percentil de positividade das técnicas de imunohistoquímica (70,5%), hibridização *in situ* (48,9%), PCR (20,5%) e isolamento (0%) de *Francisella* spp. em tilápia-do-Nilo e trutas (água-doce). Por meio de teste para identificação de duas proporções independentes. **B.** Percentil de positividade das técnicas de imunohistoquímica (47,5%), hibridização *in situ* (60%), PCR (47,5%), e isolamento (0%) de *Francisella* spp. em bijupirás (água-salgada).

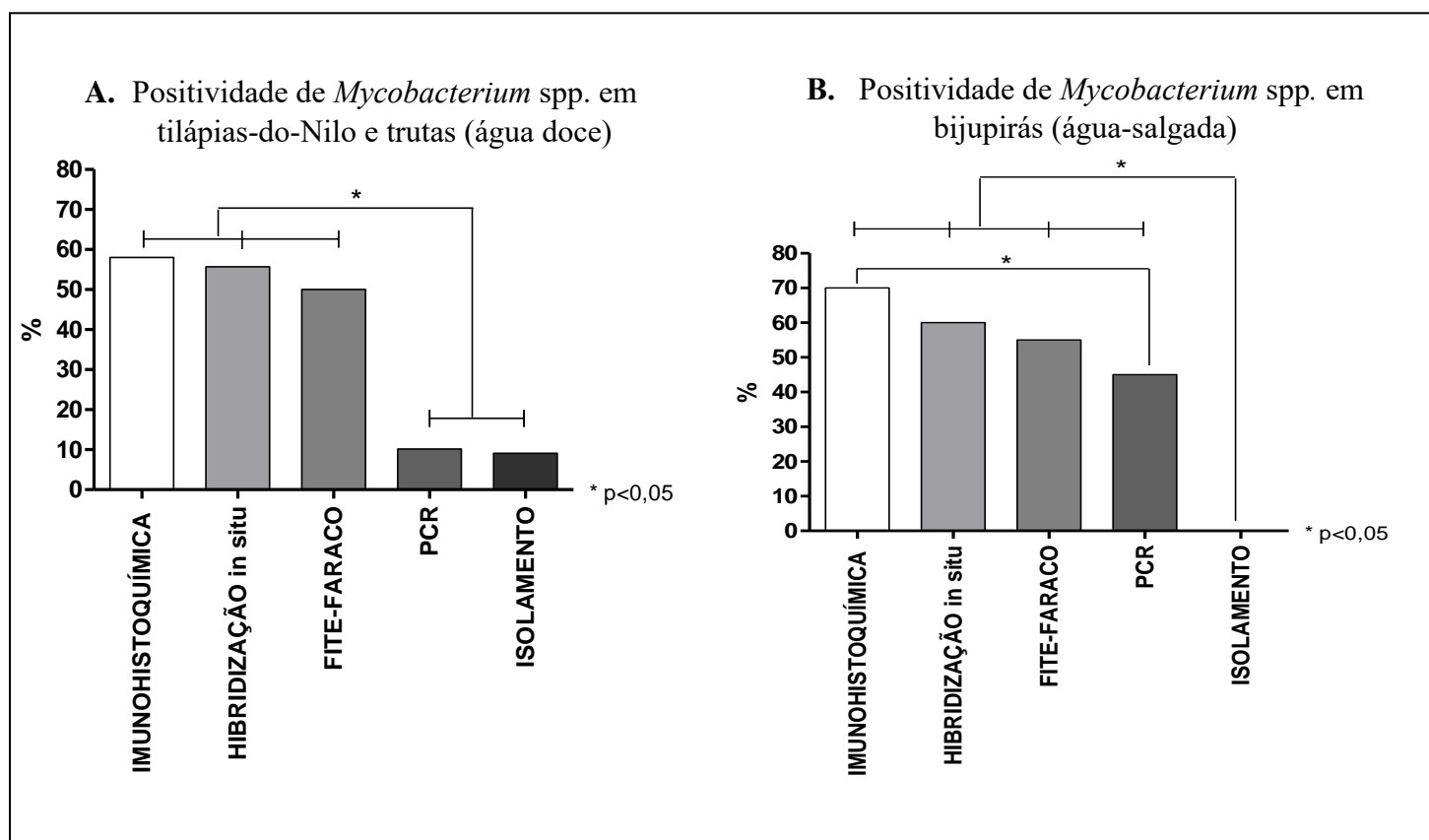
### 5.8.2. Análise comparativa das técnicas de diagnóstico para *Mycobacterium* spp.

A análise comparativa entre as técnicas imunohistoquímica, hibridização *in situ*, Fite-Faraco, PCR e isolamento bacteriano, realizadas nas amostras coletadas de tilápias-do-Nilo e trutas (água-doce) e bijupirás (água-salgada), indica a relação de amostras positivas e a porcentagem de detecção da bactéria em cada uma das técnicas em relação ao número amostral.

Para os peixes de água doce, foi observado que as técnicas imunohistoquímica, hibridização *in situ*, e Fite-Faraco apresentaram uma positividade significativa, quando comparadas com as técnicas de PCR e isolamento. Porém, não foi identificada diferença estatística entre as técnicas de imunohistoquímica, hibridização *in situ*, e Fite-Faraco.

Já a análise estatística realizada para os peixes de água salgada, foi observado que a técnica de imunohistoquímica apresentou uma positividade significativa, quando comparada com as técnicas de PCR e de isolamento. Também se observou que as técnicas de hibridização *in situ*, Fite-Faraco, e PCR apresentaram uma positividade significativa, quando comparadas com a técnica de isolamento. Porém, não foi identificada diferença estatística entre as técnicas de imunohistoquímica, hibridização *in situ*, e Fite-Faraco.

Foi utilizado o teste para identificação de duas proporções independentes e foi considerado  $p < 0,05$  quando o z-score da análise foi menor que -1,96 ou maior que 1,96 (Figura 28).



**Figura 28.** Identificação de *Mycobacterium* spp. em tilápias-do-Nilo e trutas (água-doce) e bijupirás (água-salgada). **A.** Percentil de positividade das técnicas de imunohistoquímica (58%), hibridização *in situ* (55,7%), Fite-Faraco (50%), PCR (10,2%) e isolamento (9,1%) de *Mycobacterium* spp. em tilápias-do-Nilo e trutas (água-doce) e bijupirás (água-salgada). **B.** Percentil de positividade das técnicas de imunohistoquímica (70%), hibridização *in situ* (60%), Fite-Faraco (55%), PCR (45%) e isolamento (0%) de *Mycobacterium* spp. em bijupirás (água-salgada). Por meio de teste para identificação de duas proporções independentes.

### 5.9. Análise de grau de concordância – Kappa

A tabela 6 apresenta um resumo dos valores de índice Kappa entre as diferentes provas para a busca de *Francisella* spp. em peixes de água doce, revelando grau de concordância insignificante entre as técnicas de isolamento e PCR, isolamento e imunohistoquímica e isolamento e hibridização *in situ*. Já entre as técnicas de PCR e imunohistoquímica e PCR e hibridização *in situ* apresentaram grau de concordância



moderado e entre as técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ* o grau de concordância foi muito bom.

**Tabela 6** – Índice de concordância *Kappa* entre testes diagnósticos de *Francisella* spp. em amostras de peixes de água doce.

<i>Francisella</i> spp. - peixes de água doce			
Teste	Teste comparativo	Índice <i>Kappa</i>	Grau Concordância <i>Kappa</i>
Isolamento	PCR	0,09	insignificante
	Imunohistoquímica	0,03	insignificante
	Hibridização <i>in situ</i>	0,03	insignificante
PCR	Imunohistoquímica	0,44	moderado
	Hibridização <i>in situ</i>	0,44	moderado
Imunohistoquímica	Hibridização <i>in situ</i>	0,91	muito bom

Com relação aos testes para o diagnóstico de *Francisella* spp. em peixes de água salgada entre as técnicas de isolamento e PCR, isolamento e imunohistoquímica, PCR e imunohistoquímica, PCR e hibridização *in situ*, apresentaram grau de concordância bom. Já entre as técnicas de isolamento e hibridização *in situ* apresentou grau de concordância moderado e entre as técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ* o grau de concordância foi muito bom (tabela 7).

**Tabela 7** – Índice de concordância *Kappa* entre testes diagnósticos de *Francisella* spp. em amostras de peixes de água salgada.

<i>Francisella</i> spp. - peixes de água salgada			
Teste	Teste comparativo	Índice <i>Kappa</i>	Grau Concordância <i>Kappa</i>
Isolamento	PCR	0,63	bom
	Imunohistoquímica	0,63	bom
	Hibridização <i>in situ</i>	0,56	moderado
PCR	Imunohistoquímica	0,69	bom
	Hibridização <i>in situ</i>	0,79	bom
Imunohistoquímica	Hibridização <i>in situ</i>	0,83	muito bom

Para o diagnóstico de *Mycobacterium* spp. em peixes de água doce pode-se observar na tabela 8 os valores de índice de concordância *Kappa* entre as diferentes

técnicas, revelando grau de concordância insignificante entre as técnicas de isolamento e PCR, isolamento e Fite-Faraco, isolamento e imunohistoquímica, isolamento e hibridização *in situ*, PCR e Fite-Faraco, PCR e imunohistoquímica e PCR e hibridização *in situ*. Já entre as técnicas de imunohistoquímica e Fite-Faraco e imunohistoquímica e hibridização *in situ* grau de concordância foi moderado e entre as técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ* o grau foi muito bom.

**Tabela 8** – Índice de concordância *Kappa* entre testes diagnósticos de *Mycobacterium* spp. em amostras de peixes de água doce.

<i>Mycobacterium</i> spp. - peixes de água doce			
<i>Teste</i>	<i>Teste comparativo</i>	<i>Índice Kappa</i>	<i>Grau Concordância Kappa</i>
Isolamento	PCR	0,15	insignificante
	Fite - Faraco	0,09	insignificante
	Imunohistoquímica	0,13	insignificante
	Hibridização <i>in situ</i>	0,14	insignificante
PCR	Fite - Faraco	0,07	insignificante
	Imunohistoquímica	0,07	insignificante
	Hibridização <i>in situ</i>	0,08	insignificante
Imunohistoquímica	Fite - Faraco	0,54	moderado
	Hibridização <i>in situ</i>	0,95	muito bom
Hibridização <i>in situ</i>	Fite - Faraco	0,59	moderado

Com relação aos testes para o diagnóstico de *Mycobacterium* spp. em peixes de água salgada pode-se observar que o grau de concordância entre as técnicas de isolamento e PCR, isolamento e imunohistoquímica, isolamento e hibridização *in situ*, PCR e Fite-Faraco, PCR e hibridização *in situ* e imunohistoquímica e hibridização *in situ*, foi de moderado. Já entre as técnicas de isolamento e Fite-Faraco, PCR e imunohistoquímica, imunohistoquímica e hibridização *in situ* e hibridização *in situ* e Fite-Faraco o grau de concordância foi bom (tabela 9).

**Tabela 9** – Índice de concordância *Kappa* entre testes diagnósticos de *Mycobacterium* spp. em amostras de peixes de água salgada.

<i>Mycobacterium</i> spp. - peixes de água salgada			
Teste	Teste comparativo	Índice <i>Kappa</i>	Grau Concordância <i>Kappa</i>
Isolamento	PCR	0,57	moderado
	Fite - Faraco	0,65	bom
	Imunohistoquímica	0,5	moderado
	Hibridização <i>in situ</i>	0,54	moderado
PCR	Fite - Faraco	0,48	moderado
	Imunohistoquímica	0,63	bom
	Hibridização <i>in situ</i>	0,58	moderado
Imunohistoquímica	Fite - Faraco	0,73	bom
	Hibridização <i>in situ</i>	0,94	muito bom
Hibridização <i>in situ</i>	Fite - Faraco	0,75	bom

## 6. DISCUSSÃO

Altas densidades de peixes nas criações constituem um ambiente favorável a surtos epizooticos por diferentes agentes etiológicos (PULKKINEN et al., 2009; LEIRA et al., 2017). Diversas enfermidades bacterianas em peixes de água doce e marinha, que há alguns anos eram de pouca expressão ou mesmo sequer haviam sido diagnosticadas no Brasil, hoje impõem consideráveis prejuízos econômicos ao setor (KUBITZA, 2008).

A manifestação clínica de uma enfermidade infecciosa está associada à interação entre o hospedeiro e o microrganismo, podendo ser afetada pelo estado imunológico do hospedeiro e/ou pela capacidade de virulência microbiana. O diagnóstico definitivo necessita de um conjunto de fatores como: análise de sinais e sintomas; histórico e dados laboratoriais, bem como a sensibilidade da técnica que deve estar intimamente ligada a identificação do patógeno, podendo depender da carga microbiana presente na amostra. (BARON, 1996).

Os granulomas, que são lesões brancas e/ou amarelas, firmes, podendo ser calcificadas, podem se manifestar por inúmeras causas, como por exemplo: corpos estranhos (MANRIQUE, 2012; ROBERTS; RODGER, 2012); infecções bacterianas por *Mycobacterium* spp. (MATUSHIMA et al., 2006; FRANCIS-FLOYD, 2011; MANRIQUE, 2012; ROBERTS; RODGER, 2012), *Francisella* spp. (SOTO et al., 2012; RAGHIANTE et al., 2017), *Nocardia* spp. (LABRIE et al., 2008), *Edwardsiella tarda* (PIRARAT et al., 2006), *Flavobacterium* sp. (KLUGE, 1965), *Citrobacter freundii* (PÁDUA et al., 2014), *Renibacterium salmoninarum* (ROBERTS; RODGER, 2012), *Streptococcus agalactiae* (SOTO et al., 2016); parasitas ou certos oomicetos e fungos como o *Ichthyophonus hoferi* e o *Aphanomyces invadans* (ROBERTS & RODGER, 2012).

No presente estudo, nas amostras de peixes necropsiados, foi possível observar lesões macroscópicas típicas, com presença de granulomas no baço, fígado e rim, semelhantes a nódulos de Ghon, com aspecto caseoso, circunscrito, firme e em quantidades variadas. Bruno et al. (1998) descreveram em amostras de peixes (salmões) presença de múltiplos nódulos miliares granulomatosos, de aproximadamente 1 a 3 mm de diâmetro, de coloração branco acinzentado em rim e presença de granulomas em fígado e baço, além de esplenomegalia.

Nódulos com presença de material esbranquiçados são frequentemente observados quando ocorre suspeita de infecção bacteriana, principalmente de Franciselose corroborando os achados por Hsieh et al. (2005) e Soto et al. (2010).

A bactéria *Francisella noatunensis* possui caráter fastidioso, exigente, requer meios de cultura complexos, e crescimento lento e, assim historicamente seu isolamento tem sido desafiador (OSTLAND et al., 2006 ; HSIEH et al., 2007 ; JEFFERY et al., 2010). Assis et al. (2017) demonstraram as limitações e a baixa sensibilidade do método de isolamento da bactéria como técnica diagnóstica para a franciselose. Neste estudo, não foi possível o isolamento da bactéria, mesmo com a utilização de meio de cultivo apropriado enriquecido com cisteína e soro fetal bovino como descrito por Colquhoun; Duodu (2011).

O gênero *Mycobacterium* também possui características exigentes para seu isolamento, requerendo para seu cultivo o uso de meio específico, como por exemplo, o Lowenstein-Jensen a 37°C ou temperatura ambiente, necessitando de 2-3 semanas para o aparecimento de colônias (VINCENT et al. 2003).

No presente trabalho, foi possível o isolamento e genotipificação de duas espécies de micobactérias em tilápias-do-Nilo: *Mycobacterium fortuitum*, corroborando com Lara-Flores et al. (2014), Hatem et al. (2021), e *Mycobacterium paragordoniae*, como descrito por Machida, et al. (2021), que isolaram esta espécie de micobactéria em Carpa Koi (*Cyprinus carpio*). Essas micobactérias são umas das principais espécies causadoras das micobacterioses dos peixes, além de serem zoonóticas (NOGA et al., 1990; ISHIKAWA et al., 2001; SPICKLER, 2006; JACOBS et al., 2009). Não foi possível o isolamento do agente nas amostras de bijupirás, entretanto Lowry; Smith (2006) isolaram a espécie *M. marinum* em juvenis de bijupirás, importados da Flórida, sendo o primeiro relato de isolamento nessa espécie.

No presente estudo também não foi possível o isolamento de micobactérias nas amostras de trutas, porém há relatos na literatura de isolamento de *M. chelonae* subespécies *chelonae* subespécies *abscessus* em amostras de salmonídeos, conforme descritos por Arakawa & Fryer (1984) nos Estados Unidos. Já Bruno et al. (1998) detectaram *M. chelonae* na espécie *Salmo salar* na Escócia, por meio do cultivo

microbiológico e a PCR. E por fim, no Chile, Suarez et al. (2021) confirmaram e caracterizaram genomicamente cepas de *Mycobacterium* spp. em amostras de salmão.

As técnicas histoquímicas são de grande valor para a pesquisa e diagnóstico sugestivo de diversas enfermidades. São técnicas comumente utilizadas para triagem e rotina em laboratórios, mas apresentam baixa sensibilidade e especificidade dependendo do agente e pela utilização de anticorpos policlonais (CHEDORE et al., 2006; SANDHIKA et al., 2016).

Microscopicamente, Birkbeck et al. (2011) descreveram a capacidade da *Francisella* sobreviver dentro dos macrófagos, células reticuloendoteliais e hepatócitos, característica também observada no gênero *Mycobacterium* (EL-ETR et al., 2001), causando granulomas multifocais nos órgãos, que constituem em uma mistura de células epiteliais, macrófagos com vacúolo citoplasmático e podendo ou não ser caseoso (SOTO et al., 2009; JEFFERY et al., 2010; COLQUHOUN; DUODU, 2011; SOTO et al., 2012; CAMUS et al., 2013).

No presente estudo, os achados histopatológicos observados foram: lesões granulomatosas no rim e baço em maior quantidade e em menor quantidade no hepatopâncreas, mostrando também a disseminação dos agentes bacterianos via digestória pelo fígado e por via hematológica pelos demais órgãos. Presenças de hemorragias no baço, rim e fígado, congestão de vasos, presença de eosinófilos e presença de melanomacrófaos. Nos rins foram encontrados túbulo glomerulonefrite monolinfocitária, tubulonefrose e aumento do espaço de Bowman. Suarez et al. (2021) encontraram em salmões com suspeita de *Mycobacterium* presença de múltiplos focos de células mononucleares uma variável infiltração de células mononucleares em fígado e no parênquima do baço. Em contrapartida, Bruno et al. (1998) relataram a presença de grandes nódulos compactados de forma circulatória nos rins, fígado e baço. Esses nódulos compreendiam células epitelióides e não tinham cápsula circundante ou depósito de fibrina e/ou necrose central. Foram encontradas também congestão de vasos, presença de eosinófilos, corroborando os achados do presente estudo.

O processamento das amostras nas técnicas de Ziehl-Neelsen variação Fite-Faraco, imunohistoquímica e hibridização *in situ*, exigiu adaptações necessárias, pois os peixes teleósteos possuem melanomacrófaos, macrófagos pigmentados por melanina,

hemossiderina e lipofucsina, fazendo com que essas células apresentem uma coloração amarronzada escura (MANRIQUE et al., 2019). Dessa forma, para melhor quantificação dos resultados das técnicas citadas acima, foi necessário o pré-tratamento das lâminas com o peróxido de hidrogênio a 10%, pois a coloração dos melanomacrófagos dificultava a visualização do bacilo corado pela fucsina no tecido e a marcação positiva pelo cromógeno DAB.

Diversos pesquisadores utilizaram uma solução de peróxido de hidrogênio a 10% por 18 horas em temperatura ambiente para o branqueamento de melanomas malignos. O peróxido de hidrogênio causa uma oxidação degradativa na melanina, branqueando sua coloração (KORYTOWSKI e SARNA 1990; LI et al., 1999; ROELS et al., 1999).

Para identificação do *Mycobacterium* spp. foi utilizado a técnica histoquímica Fite-Faraco, que é uma variação da técnica Ziehl-Neelsen, utilizada para coloração do bacilo em tecido fixado em formalina e parafinado (FITE 1938; FARACO 1938; FARIA 1949). Sendo comumente usada para a identificação de micobactérias em cortes histológicos, já que essas micobactérias em peixes possuem pouco ácido micólico e dessa forma se coram mal pelo Ziehl-Neelsen, podendo gerar resultados falsos negativos (ROMANO, et al. 2012; LARA-FLORES, et al. 2014; MARTINS, et al. 2017; GJURČEVIĆ, et al. 2020; ROMANO, et al. 2020).

No presente estudo, foi possível observar bacilos álcool-ácido resistentes sugestivos de micobactéria em 53% (44/83) das tilápias e em 45% (18/40) dos bijupirás. Não foi observada a coloração do bacilo nas trutas. Parisot e Decker (1959) compararam técnicas padrões de Ziehl-Neelsen e Fite-Faraco em seu estudo experimental com tecido humano e de salmão, testando modificações no protocolo: pré-tratamento dos cortes (glicerol, álcool absoluto e /ou 6% de ácido sulfúrico por dez minutos para cada reagente), variação das concentrações dos agentes descolorantes, diferentes métodos de contra coloração e combinações dos três primeiros. Os melhores resultados na coloração dos bacilos no tecido de salmão foram nos métodos que incluíram ácido sulfúrico na descoloração e pré tratados com glicerol, evidenciando que o método Fite-Faraco provou ser o melhor para colorir os bacilos em tecido de peixes salmonídeos.

Outra técnica molecular de grande valor para a identificação de *Mycobacterium* spp em amostras clínicas é a PCR. De Los Monteiros et al. (1998) e Shah et al. (2002)

não observaram resultados positivos com o uso de primers específicos diretamente de amostras clínicas de tecidos, somente a partir de colônias isoladas do *Mycobacterium* spp., corroborando os nossos resultados iniciais do presente projeto, tal fato pode ser devido à baixa quantidade de bactérias no fragmento de tecido coletado (TOMASO et al. 2010; ALCAIDE et al. 2019). ou pela metodologia de extração por coluna, que foi a primeira técnica utilizada no presente estudo, como descrito pelos autores Nakatani et al. (2004) e Moura et al., (2016), que observaram que a eficiência dos métodos moleculares é diretamente correlacionada com a eficácia do método de extração para o *Mycobacterium tuberculosis* em tecido bovino com lesões granulomatosas sugestivas de tuberculose.

Kramme et al. (2004) sugerem que a inibição da extração seja pelas características das micobactérias devido à rigidez de sua parede. Alternativas para melhorar a eficácia na obtenção do DNA da micobactéria é a utilização de tampões de lise antes da extração, como por exemplo o tampão ATL (*Qiagen*®) e o uso da proteinase k (MOURA et al., 2016; KRAMME et al., 2004).

Já no presente trabalho a detecção de *Mycobacterium* spp. em amostras de peixes diretamente do material extraído resultou em 25% (32/128) das amostras clínicas de órgãos com o reagente comercial DNAzol (*Invitrogen*®), e de acordo com Nassar (2006), o método de extração com o uso do reagente comercial DNAzol (*Invitrogen*®), mostrou-se mais eficaz que outros métodos de extração utilizados na detecção do *Mycobacterium bovis* em amostras clínicas.

Para a identificação do material genético do gênero *Francisella* nas amostras por PCR, foi utilizado o método de extração por coluna que, diferentemente dos resultados obtidos para as micobactérias, se mostrou eficaz para a extração de DNA desse gênero bacteriano, sendo possível à amplificação em 28% (37/128) nas amostras clínicas. Corroborando com diversos autores que utilizam dessa metodologia para a identificação da *Francisella* em peixes, como descrito por Soto et al. (2012) que utilizaram a técnica para identificação do gênero bacteriano em amostras de DNA extraído de blocos de parafina contendo órgãos de tilápia-do-Nilo, obtendo 47 de 68 amostras positivas. Já López-Crespo et al. (2019) e Chang et al. (2021) identificaram o material genético da *Francisella noatunensis* através da PCR em peixes da família dos ciclídeos. Soto et al. (2019a) usaram da técnica molecular para confirmar o isolamento da *Francisella noatunensis* em tilápias-do-Nilo e Carreon (2021) e seus colaboradores empregaram a



PCR para amplificar o material genético da *Francisella* em 98% (49/50) de amostras clínicas de tilápias-do-Nilo.

Outras técnicas realizadas no presente trabalho para identificação das bactérias em tecido fixado e parafinado são: a imunohistoquímica e a hibridização *in situ*. Diversos autores utilizam essas técnicas para o diagnóstico de microrganismos de caráter fastidioso, de difícil isolamento e para o estudo retrospectivo em material parafinado (MANIATIS, 2000; CRUMLISH, 2007; ZERIHUN, 2011). Soto et al. (2012) observaram a presença da marcação positiva pela imunohistoquímica em 45/68 para o gênero *Francisella* em amostras de peixes, em um estudo retrospectivo de material parafinado. Já no presente estudo observamos a marcação em 62/128 amostras.

Já para a técnica de hibridização *in situ*, Nguyen et al. (2019), utilizaram a técnica ISH em um estudo para verificar a presença da *Francisella* no sistema reprodutor e órgãos de tilápia-do-Nilo, corroborando também com os achados do presente estudo, pois foi possível fazer a marcação do material genético do agente em órgãos das tilápias-do-Nilo e dos bijupirás nas amostras clínicas. Esses resultados sugerem o potencial e a eficácia desses métodos histoquímicos/moleculares para o diagnóstico e a investigação de microrganismos fastidiosos causadores de doenças granulomatosas.

Na comparação entre as técnicas: isolamento, PCR, hibridização *in situ* e imunohistoquímica utilizadas para a identificação da *Francisella* spp. e *Mycobacterium* spp., nota-se que ocorreram variações nos resultados, uma heterogeneidade entre a PCR e as demais técnicas e uma homogeneidade entre a imunohistoquímica e a ISH.

Com relação a PCR, existem fatores que podem inviabilizar o resultado da técnica molecular, como presença de inibidores, dificuldades na extração de DNA e/ou baixa quantidade de DNA da bactéria no fragmento que foi coletado para realização da PCR (SAMBROOK et al., 1989; PICKEN et al., 1996; MELO, 2006).

Ressalta-se que em relação a imunohistoquímica e a ISH, foi utilizado o mesmo fragmento de tecido para realização das duas técnicas. Foi feito corte seriado em duas lâminas distintas e realizada a imunohistoquímica em uma lâmina e a ISH em outra. Porém, a não marcação do epítipo ou a não hibridização no DNA possa ser devido à cronicidade da doença nos animais do estudo ou pequenas quantidades de células teciduais contendo o agente, sendo fatores limitantes, o que poderia justificar a ausência

da marcação em algumas amostras, mesmo apresentando características histopatológicas como a presença de granulomas (DOSTER e LIN, 1988; PRUDENT et al., 2018). Crothers, et al. (2021) descrevem a utilização da imunohistoquímica como uma ferramenta sensível e eficiente no diagnóstico de infecções por micobactérias, sendo um teste de rastreamento rápido dentre os testes moleculares, apresentando uma sensibilidade diagnóstica superior ao Ziehl-Neelsen.

Sugere-se também, uma coinfeção entre o *Mycobacterium* spp. e a *Francisella* spp., pois foram obtidos resultados positivos na mesma amostra para os dois agentes bacterianos, por meio das técnicas de PCR, imunohistoquímica e hibridização *in situ*, além da presença de granulomas pela histopatologia (H&E). Corroborando com os estudos de diversas espécies de peixes, os quais demonstram a ocorrência de coinfeção por múltiplos patógenos, entre bactérias, bactérias e parasitas e até mesmo bactérias e vírus, que ocorrem naturalmente no habitat (XU et al., 2007; SOTO et al., 2012; ANDREE et al., 2013; LHORENTE et al., 2014; DONG et al. 2015; PARDO-LÓPEZ, 2017; FERREIRA JUNIOR, 2018).

Doenças bacterianas zoonóticas quase sempre estão relacionadas a deficiência nas boas práticas de manejo dos peixes (YANONG; POUDER, 2010). A literatura cita as micobacterioses pelas espécies *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum* e *M. chelonae* como sendo as mais comuns que infectam os seres humanos, sendo conhecida como uma doença ocupacional em trabalhadores de pisciculturas comerciais, aquários ou até mesmo de locais públicos contaminados, causando lesões crônicas granulomatosas de difícil tratamento (CHEUNG et al., 2012; ESSA et al., 2009; PATE et al., 2005; WHIPPS et al., 2012).

Vários membros do gênero *Mycobacterium* causam infecções em animais e humanos (MERINO et al., 2020; SUAREZ et al., 2021). Em peixes, a micobacteriose é caracterizada como uma doença crônica progressiva, com diversos sinais clínicos, como emaciação, inflamação da pele, exoftalmia, ulceração e lesões supuradas (AUSTIN; AUSTIN, 2016).

Através dos resultados estatísticos obtidos pelo teste de comparação de duas proporções com distribuição amostral de Bernoulli (MOOD et al., 1974) e o índice de concordância *Kappa* (TANG et al., 2015) entre as diferentes provas, sugere-se que os

testes morfológicos (imunohistoquímica e hibridização *in situ*) têm maior grau de concordância.

Os métodos convencionais de isolamento e identificação de microrganismos podem apresentar limitações quanto à sensibilidade e especificidade, ou por necessitar de meios de cultivos especiais (BOYE et al., 2006) e as técnicas baseadas na PCR facilitam a detecção rápida e sensível de bactérias independentemente de serem ou não cultiváveis, porém estas técnicas não podem fornecer dados como a distribuição espacial dos agentes etiológicos no tecido ou a sua associação com as lesões (AMANN et al., 2001). Também com relação à PCR, pode-se justificar a não detecção do DNA em algumas amostras de *pools* de órgãos testadas e positivas para ISH e imunohistoquímica à degradação do DNA por autólise (SHIBATA, 1994).

Como alternativa ao método bacteriológico convencional, métodos *in situ* que utilizam anticorpos ou sondas de oligonucleotídeos, estão sendo aprimorados para detecção de diversos patógenos (AMANN et al., 2001; BOYE et al., 2006). A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) ou a hibridização *in situ* (ISH) são métodos histoquímicos que permitem a identificação, visualização e a localização simultânea de microrganismos. São métodos que consistem na marcação e visualização direta em microscópios óticos e/ou fluorescentes em cortes histológicos, levando a combinação da precisão da molecular com a informação visual do microscópio ótico (SUI et al., 2009).

Com relação a ISH e a imunohistoquímica a grande vantagem da IHS é a simplicidade de sintetizar as sondas específicas marcadas, do que a produção de anticorpos monoclonais ou policlonais. Entretanto, a ISH tem a desvantagem de necessitar de equipamento específico para ocorrer a hibridação da sonda (SUI et al., 2009).

A amostragem e fragmentação do tecido pode ter sido os fatores que podem ter levado a falta de concordância das técnicas, principalmente entre as técnicas morfológicas, a PCR e o isolamento, pois uma porção de tecido foi alíquotado para as técnicas de ISH e imunohistoquímica, outra para PCR e outra para o isolamento, podendo assim as bactérias estarem presentes em uma porção, mas nas outras não (CABRAL, 2008). Todavia, a elaboração de cortes seriados de um mesmo bloco de parafina pode aumentar as chances de obtenção dos microrganismos no fragmento de tecido, porém confeccionar diversas lâminas para ISH ou imunohistoquímica necessitam de lâminas

silanizadas específicas que possuem um alto custo, elevando o valor da análise, além de serem técnicas laboriosas, portanto estes vieses devem ser levados em conta na escolha da(s) técnica(s) diagnóstica(s) a ser(em) utilizada(s).

Contudo, um diagnóstico baseado na associação de técnicas com a utilização de técnicas morfológicas (imunohistoquímica e hibridização *in situ*) e/ou associada a PCR para a identificação dos agentes etiológicos de doenças bacterianas granulomatosas de importância comercial e zoonótica são mais viáveis, devido à baixa sensibilidade da técnica de isolamento para esses microrganismos, pois o que determina a acurácia da utilidade clínica de um teste diagnóstico é a capacidade de identificar uma determinada doença (COSTA et al., 2004). Por se tratar de microrganismos de caráter fastidioso, de crescimento lento, e de requererem meios seletivos e complexos, torna-se necessário um diagnóstico baseado na associação técnicas para a identificação dos agentes etiológicos de doenças bacterianas granulomatosas de importância comercial e zoonótica, a fim de evitar pareceres inconclusivos em casos suspeitos.

Além de necessitar de novas pesquisas para elucidar melhor a interação e coinfeção entre os gêneros bacterianos em estudo, em específico para compreender os parâmetros que envolvem a infecção, epidemiologia e prejuízos dessas bactérias na piscicultura nacional.

## 7. CONCLUSÕES

- No presente estudo foram confirmadas a presença das espécies bacterianas: *Francisella* spp., *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium paragordoniae* e *Mycobacterium* spp. em peixes de pisciculturas comerciais no sudeste do Brasil. Os resultados indicam a ocorrência de coinfeções bacterianas, tornado mais complexo um diagnóstico assertivo.
- Foi possível a visualização macroscópica e histopatológica das lesões granulomatosas sugestivas dos agentes estudados, contribuindo como um método de triagem e sugestivo para um diagnóstico mais conclusivo.
- Não foi possível o isolamento bacteriano do gênero *Francisella*, mesmo com a utilização de meio de cultivo apropriado enriquecido com cisteína e soro fetal bovino.
- Foi possível o isolamento de oito colônias do gênero *Mycobacterium* spp. somente em amostras de tilápias-do-Nilo.
- Com a padronização da extração de DNA e a utilização da PCR, foi identificada a presença do DNA para a *Francisella* spp. em 28,9% (37/128) das amostras e do *Mycobacterium* spp. em 25% (32/128) do total de amostras analisadas.
- Com a padronização das técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ* foi identificada a presença de epítomos da *Francisella* spp. em 48,4% (62/128) amostras e do *Mycobacterium* spp. em 61,7% (79/128) amostras e do DNA da *Francisella* spp. em 52,3% (67/128) amostras e do *Mycobacterium* spp. em 57% (73/128).
- No sequenciamento por SANGER foi possível identificar as seguintes espécies e gêneros: *Francisella* spp., *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium paragordoniae* e *Mycobacterium* spp. nas amostras clínicas utilizadas no presente estudo.

- Para a *Francisella*, nas tilápias-do-Nilo e trutas (peixes de água doce), as técnicas morfológicas (imunohistoquímica e hibridização *in situ*), foram mais eficientes para detecção do patógeno quando comparados com a PCR e isolamento. Já nos bijupirás (peixes de água salgada), para *Francisella*, as técnicas morfológicas e PCR foram mais eficientes para detecção do patógeno quando comparados com o isolamento.
- Para o *Mycobacterium*, nas tilápias-do-Nilo e trutas (peixes de água doce), as técnicas morfológicas (imunohistoquímica e hibridização *in situ* e Fite-Faraco) foram mais eficientes quando comparados com a PCR e isolamento. Já nos bijupirás (peixes de água salgada), para o *Mycobacterium* não foi observado uma diferença estatística entre as técnicas morfológicas, porém as três técnicas apresentaram diferença significativa quando comparado a PCR e ao isolamento.

## 8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ACEBES C. R. G.; ORTIZ, L. B.; GONZÁLEZ, S. A.; LEY B. D.; FERNÁNDEZ, P. R.; SÁNCHEZ DE PAZ, F. Infecção por *Mycobacterium marinum*. Apresentação de um novo caso y revisión de la literatura. **Actas Dermosifiliogr.** v. 97, n. 10, p. 653–657, 2006.

ALCAIDE, F., TRASTOY, R., MOURE, R., GONZÁLEZ-BARDANCA, M., AMBROA, A., LÓPEZ, M., TOMÁS, M. Multiplex Real time PCR-short TUB assay for detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in smear-negative clinical samples with low mycobacterial loads. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n. 57(8), p.e00733-19, 2019.

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; TAYLOR, R. G. Economies of scale for juvenile production of common snook (*Centropomus undecimalis* Bloch). **Aquaculture Economics & Management**, London, v. 7, n. 5, p. 273-292, 2008.

AMANN, R.; FUCHS, B.M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, n.3, p.231–236, 2001.

ANDREE, K. B.; RODGERS, C. J.; FURONES, D.; GISBERT, E. Co-Infection with *Pseudomonas anguillid septica* and *Delftia acidovorans* in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.): a case history of an illegally trafficked protected species. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, p. 647–656, 2013.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA PISCICULTURA PEIXEBR 2021. Revista, São Paulo, 2021.

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

ASSIS, G. B. N.; OLIVEIRA, T. F.; GARDNER, I. A.; FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Sensitivity and specificity of real-time PCR and bacteriological culture for francisellosis in farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **J. Fish Dis.** v. 40, p. 785–795, 2017.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish.** London: Springer, p. 580, 2007.

BARON S, (Editor). **Microbiologia Médica.** 4. ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch em Galveston; 1996.

BASSON, L.; VAN, A. S. J. G. Trichodinidae e outros ciliophorans (*Phylum ciliophora*). In: Woo PTK. **Doenças e distúrbios dos peixes.** 2. ed. Cab International. Infecções por protozoários e metazoários. v1, p.154-182, 2006.

BEMER-MELCHIOR, P.; DRUGEON, H.B. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA Typing Analysis. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 7, p. 2350-2351, 1999.

BENETTI, D. D.; O'HANLON, B.; RIVERA, J. A.; WELCH, A. W.; MAXEY, C.; ORHUN, M. R. Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in open ocean submerged cages in the Caribbean. **Aquaculture**, v. 302, p. 3-4, 2010.

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

BOYE, M.; AALBAEK, B.; AGERHOLM, J.S. *Fusobacterium necrophorum* determined as abortifacient in sheep by laser capture microdissection and fluorescence in situ hybridization. **Molecular and Cellular Probes**, v.20, p.330-336, 2006.

BORCHARDT, A. C. **Detecção de *Mycobacterium* spp. Pela técnica de PCR utilizando como alvo a região espaçadora intergênica 16S-23S rDNA.** Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Luterana, 2009.

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

BRUNO, D. W.; GRIFFITHS, J.; MITCHELL, C. G.; WOOD, B. P.; FLETCHER, Z. J.; DROBNIOWSKI, F. A.; HASTINGS, T. S. Pathology attributed to *Mycobacterium chelonae* infection among farmed and laboratory-infected Atlantic salmon *Salmo salar*. **Dis Aquat Organ**. v. 2, p. 19-33, 1998.

CABRAL, A. D. **Pesquisa de *Neospora caninum* em fetos bovinos abortados utilizando análises histológicas (HE), imunoistoquímica (IHQ) e nested PCR.** 2008. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

CARREON, M. M.; VIADANNA, P. H. de O.; HIRANO, L. Q. L.; FERNANDEZ-ALARCON, M. F.; CASTRO, I. P.; de JUNQUEIRA JUNIOR, D. G.; SILVA, H. O.; COSTA, F. A. A.; LIMA, A. M. C. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* outbreak in Nile tilapia juveniles cultivated in net cages in the Araguari river basin, Brazil. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. e40101119332, 2021.

CASSIANO, L. L.; MARTINS, A. M. C. R. P. F.; CATROXO, M. H. B. SOUZA R. B.; OGATA R. A.; RUIZ V. L. A.; HIPOLITO M. Implementation of histopathological



techniques and transmission electron microscopy for research of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine. **International Journal of Environmental and Agriculture Research**, Bikaner, v. 3, n. 4, p. 6-11, 2017.

CAVALLI, R. O.; HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá. **Revista Brasileira de Reprodução Animal Suplemento**, v. 6, p. 64–69, 2009.

CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. **Bacteriología de la tuberculosis humana y animal**. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud. (Series de Monografías Científicas y Técnicas), 1979, p. 63.

CHANG, C.-H.; POUDYAL, S.; PULPIPAT, T.; WANG, P.-C.; CHEN, S.-C. Pathological Manifestations of *Francisella orientalis* in the Green Texas Cichlid (*Herichthys cyanoguttatus*). **Animals**, v.11, n. 8, p. 2284, 2021.

CHANG, D. O cultivo de Bijupirá em Taiwan. **Panorama da Aquicultura**, v. 13, p. 43-49, 2003.

CHEDORE, P, BROUKHANSKI, G, SHAINHOUSE, Z, JAMIESON, F. False-positive amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test results for samples containing *Mycobacterium leprae*. **J Clin Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 612-613, 2006.

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

CHEUNG, J. P.; FUNG, B.; IP, W. Y.; CHOW, S. P.; *Mycobacterium marinum* infection of the hand and wrist. **J Orthop Surg**, v. 20, n. 2, p. 214–218, 2012.

CLEMENS, D. L.; LEE, B. Y; HORWITZ, M. A. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. **Infect Immun**, v. 72, p. 3204–3217, 2004.

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

COLQUHOUN, D.J., DUODU, S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 47, 2011.

CORNER, L. A. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 53-63, 1994.

COSTA, R. M. S.; VELASCO, T. R.; COSTA, L. S.; RODRIGUES, M. L. V. Eficácia da associação de métodos diagnósticos no rastreamento do glaucoma. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, n. 1, p. 37-41, 2004.

CROTHERS, J. W.; LAGA, A. C.; SOLOMON, I. H. Clinical Performance of Mycobacterial Immunohistochemistry in Anatomic Pathology Specimens: The Beginning of the End for Ziehl-Neelsen?. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 155, n. 1, p. 97–105, 2021.

CRUMLISH, M.; DIAB, A. M.; GEORGE, S.; FERGUSON, H. W. Detection of the bacterium *Flavobacterium psychrophilum* from a natural infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), using formalin-fixed, wax-embedded fish tissues. **J Fish Dis**, v. 30, p. 37–41, 2007.

DE LOS MONTEROS, L. E. E.; J. C.; GUTIÉRREZ, M.; SAMPER, S.; MARÍN, J. F. G.; MARTÍN, C.; DOMÍNGUEZ, L.; DE RAFAEL, L.; BAQUERO, F.; GÓMEZ-MAMPASO, E.; BLÁZQUEZ, J. Allele-Specific PCR Method Based on pncA and oxyR Sequences for Distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intraspecific *M. bovis* pncA Sequence Polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, n. 1, p. 239-242; 1998.

DECOSTERE, A.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F. Piscine mycobacteriosis: a literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. **Vet Microbiol**. v. 99, n. 3- 4, p. 159–166, 2004.

DELBON, M. C. **Análises cromatográficas e parâmetros hematológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus*, anestesiadas com eugenol em condições laboratoriais e de transporte**. 2010. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2010.

DONG, H. T.; NGUYEN, V. V.; LE, H. D.; SANGSURIYA, P.; JITRAKORN, S.; SAKSMERPROME, V.; SENAPIN, S.; RODKHUM, C. Naturally concurrent infections of bacterial and viral pathogens in disease outbreaks in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farms. **Aquaculture**, v. 448, p. 427–435, 2015.

DOSTER, A. R.; LIN, B.C. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immune peroxidase method. **Am. Journal Veterinary Research**, v. 49, p. 1719-21, 1988.

EL-ETR, S. H.; YAN, L.; CIRILLO, J. D. Fish monocytes as a model for mycobacterial host-pathogen interactions. **Infect Immun**, v. 69, n. 12, p. 7310-7317, 2001.

EMBRAPA - Pesca e aquicultura. Palmas (2017). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/>>. Acesso em: setembro. 2020.

ESSA, M. A. A.; KENAWY, A. M.; EL-GAWAD, D. M. A. Epizootiological and histopathological studies on Mycobacteriosis in some ornamental fishes. **Glob Vet**, v. 3, n. 2, p. 137-43, 2009.

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Relatório sobre o estado da Pesca e Aquicultura a nível mundial, São Paulo: SOFIA 2020.

Disponível em: <http://www.fao.org/publications/sofia/2020/en/>. Acesso em: setembro, 2020.

FARACO, J. Bacillos de Hansen and paraffin cuts. Complementary method for researching Hansen's lacework in cuts of material included in paraffin. **Rev. bras. Leprol.**, v. 6, n. 2, p. 177-80, 1938.

FARIA, J. L. Value of the Faraco method for staining the Hansen bacillus in cuts. **Rev. bras. Leprol.**, v. 17, n. 1, p. 18-26, 1949.

FERREIRA JUNIOR, J. A. **Caracterização anatomopatológica das lesões de filés de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) induzidas por *Streptococcus agalactiae* e *Francisella noatunensis orientalis***. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade De Brasília, Brasília, 2018.

FITE, G. L. The staining of acid-fast bacilli in paraffin sections. **Amer. J. Path.**, v. 14, n. 1, p. 491-507, 1938.

FRANCIS-FLOYD, R. Mycobacterial infections of fish. **Southern Regional Aquaculture Center**, n. 4706, p. 01-12, 2011.

FRYDRYCH, L. M.; BIAN, G.; O'LONE, D. E.; WARD, P. A.; DELANO, M. J. Obesity and type 2 diabetes mellitus drive immune dysfunction, infection development, and sepsis mortality. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 104, n. 3, p. 525-534, 2018.

FUREVIK, A.; PETTERSEN, E. F.; COLQUHOUN, D.; WERGELAND, H. I.; The intracellular lifestyle of *Francisella noatunensis* is in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) leucocytes. **Fish Shellfish Immunol**, v. 30, p. 488–494, 2011.

GIAVENNI, R.; FINAZZI, M.; POLI, G.; GRIMALDI, E. Tuberculosis in marine tropical fishes in na aquarium. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 1980.

GIMENO, E. Fundamentos de imunohistoquímica aplicada a patologia veterinária. **Encontro Nacional de Patologia Veterinária**, v. 7, p. 17-51, 1995.

GJURČEVIĆ, E., KUŽIR, S., ŽMAK, L., OBROVAC, M., GUDAN KURILJ, A., SAVOCA, S.; MATANOVIĆ, K. A case of mycobacteriosis in farmed pikeperch (*Sander lucioperca*) cultured in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 11, p. 4824–4827, 2020.

GOLOVLIOV, I.; BARANOV, V.; KROCOVA, Z.; KOVAROVA, H.; SJOSTEDT, A. An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. **Infect Immun**, v. 71, p. 5940–5950, 2003.

GOMES, M. J. P. Gênero *Mycobacterium* spp. Microbiologia Clínica Veterinária VET 3225. ÁREA DE BACTERIOLOGIA, UFRGS, 2011. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Mycobacterium%204-2013-1.pdf>. Acesso em: 15/09/2020.

GONÇALVES, L. A. **Genômica comparativa de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis***. 2015. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal De Minas Gerais, Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

GRIGORAKIS, K.; RIGOS, G. Aquaculture effects on environmental and public welfare – The case of Mediterranean mariculture, **Chemosphere**, v. 85, p. 899-919, 2011.

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

HALL, G. L.; SLY, P. D.; FUKUSHIMA, T.; KUSEL, M. M.; FRANKLIN, P. J.; HORAK, JR. F.; PATTERSON, H.; GANGELL, C.; STICK, S. M. Respiratory function in healthy young children using forced oscillations. **Thorax**, v. 62, p. 521–526, 2007.

HATEM, M.; NASR, E.; MOHAMED, S.; MARZOUK, FATMA, A., S., MOHAMED, MAHMOUD, H., MOHMED L. Comparison between conventional and recent culture methods for detection of fish mycobacteria. **New Valley Veterinary Journal**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2021.

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

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

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

ISHIKAWA, C. M.; MATUSHIMA, E. R.; SOUZA, C. W. O.; TIMENETSKY, J.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Micobacteriose em peixes. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 231-242, 2001.

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

JACOBS, J. M.; STINE, C. B.; BAYA, A. M.; KENT, M. A review of mycobacteriosis in marine fish. **Journal of Fish Diseases**. v. 32, n. 2, p. 119-130, 2009.

JALED, M. M.; PEDRINI CINQUALBREZ, M. F.; GONZÁLEZ, P.; FÖRSTER FERNÁNDEZ, J.; ANAYA, J. S.; STENGEL, F. M. Infección por *Mycobacterium marinum*. Características epidemiológicas, clínicas y tratamiento. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v. 38, n. 2, p.70–5, 2010.

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

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

KAMAISHI, T.; MIWA, S.; GOTO, E.; MATSUYAMA, T.; OSEKO, N. Mass mortality of giant abalone *Haliotis gigantea* caused by a *Francisella* sp. bacterium. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 89, p. 145–154, 2010.

KLUGE, J. P. A granulomatous disease of fish produced by flavobacteria. **Pathology and Veterinary**, v. 2, p. 545-552, 1965.

KORYTOWSKI, W.; SARNA, T. Bleaching melanin pigments: A role of copper ions and hydrogen peroxide in auto oxidation and photo-oxidation of synthetic dopa-melanin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 21, p. 12410-12416, 1990.

KRAMME, S.; BRETZEL, G.; PANNING, M.; KAWUMA, J.; DROSTEN, C. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 193, n. 4, p. 189-193. 2004.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação dos peixes cultivados**. 3.Ed. Jundiaí: 1998. p. 123.

KUBITZA, F. Sanidade Aquícola: Cultivo Saudável é certeza de bons negócios. **Panorama da Aquicultura**, v. 18, 107. 2008.

LABRIE, L.; TAN, Z.; KOMAR, C.; HO, E.; GRISEZ, L. Nocardial infections in fish: an emerging problem in both freshwater and marine aquaculture systems in Asia. Diseases in **Asian Aquaculture VI. Fish Health Section**, Asian Fisheries Society, Manila, p. 297-312, 2008.

LARA-FLORES, M.; AGUIRRE-GUZMAN, G.; BALAN-ZETINA, S. B.; SONDA-SANTOS, K. Y.; ZAPATA, A. A. Identification of *Mycobacterium* agent isolated from tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, n. 2, p. 575-580, 2014.

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

LEIRA, M. H.; REGHIM, L. S.; CIACCI, L. S.; CUNHA, L. T.; BOTELHO, H. A.; BRAZ, M. S.; DIAS, N. P.; MELO, C. C. V. Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil – Uma Revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 1, p. 44-59, 2016.

LEIRA, M. H.; REGHIM, L. S.; CIACCI, L. S.; CUNHA, L. T.; BOTELHO, H. A.; BRAZ, M. S.; DIAS, N. P.; MELO, C. C. V. Problemas sanitários das pisciculturas brasileiras. **PUBVET**, v. 11, n. 6, p. 538-544, 2017.

LHORENTE, J. P.; GALLARDO, J. A.; VILLANUEVA, B.; CARABANO, M. J.; NEIRA, R. Disease resistance in Atlantic salmon (*Salmosalar*): coinfection of the intracellular bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis* and the sea louse *Caligus rogercresseyi*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95397, 2014.

LI, L. L.; CROTTY, K. A., KRIL J. J.; PALMER, A. A.; MCCARTHY, S. W. Method of melanin bleaching in MIB1-KI67 immunostaining of pigment lesions: A quantitative evaluation in malignant melanomas. **Histochemistry Journal**, v. 31, n. 4, p. 237-240. 1999.

LOM, J.; DYKOVÁ, I. Protozoários parasitas de peixes. Amsterdã: Elsevier Science; **Desenvolvimentos em Aquicultura e Ciências da Pesca**. v26. p.315, 1992.

LÓPEZ-CRESPO, R. A.; MARTÍNEZ-CHAVARRÍA, L. C.; LUGO-GARCÍA, A. T.; ROMERO-ROMERO L. P.; GARCÍA-MÁRQUEZ, L. J.; REYES-MATUTE, A. Outbreak of francisellosis (*Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*) in cultured neon jewel cichlids *Hemichromis bimaculatus* from Morelos, Mexico. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 137, n. 2, p. 125-130, 2019.

LOWRY, T.; SMITH, A. *Mycobacterium* sp. infection in cultured cobia (*Rachycentron canadum*). **Bulletin- European Association of Fish Pathologists**, v. 26, n. 2, p. 87-92, 2006.

MACHIDA, Y.; TANG, B. C. C.; YAMADA, M.; SATO, S.; NAKAJIMA, K.; MATOYAMA, H.; KATO, G. Mycobacteriosis in cultured koi carp *Cyprinus carpio* caused by *Mycobacterium paragordoniae* and two *Mycolicibacterium* spp. **Aquaculture**, v. 539, p. 736656, 2021.

MANIATIS, K.; MORRIS. D. J.; ADAMS, A.; PEARSON, M. Detection of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* in fixed tissue sections using immunohistochemistry and antigen retrieval immunohistochemistry. **Journal of Fish Diseases**, v. 23, p. 343–347, 2000.

MANRIQUE, W. G. **Estudo comparativo da resposta inflamatória crônica induzida em *Piaractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus* por corpo estranho e bacilo de Calmette-Guérin**. 2012. Tese (Doutorado em Patologia Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp, Jaboticabal, 2012.

MANRIQUE, W. G.; PEREIRA FIGUEIREDO, M. A.; CHARLIE-SILVA, I.; BELO, A. A. M.; DIB, C. C. Spleen melanomacrophage centers response of Nile tilapia during *Aeromonas hydrophila* and *Mycobacterium marinum* infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 95, p. 514-518, 2019.

MARTINS, A. M. C. R. P. F.; CASSIANO, L. L.; CATROXO, M. B.; STROEBEL, R.; RUGGIERO-COUCEIRO, A. P.; CAMPOS, C. E.; CALDAS, P. C.; RAMOS, J.; DIB, C. C.; ROXO, E.; HIPOLITO, M. *Mycobacterium gordonae* infection in freshwater fish from lakes and ponds in a park at São Paulo city, Brazil. **International Journal of Environmental and Agriculture Research**, v. 3, p. 44-48, 2017.

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

MARTINS, M. L.; AZEVEDO, T. M. P.; GHIRALDELLI, L.; BERNARDI, N. Can the parasitic fauna on Nile tilapias be affected by different production systems? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 493-500, 2010.

MATUSHIMA, E. R.; LONGATTO, A.; TAKAMI, C. Experimental chronic granulomatous inflammatory process in fish: a morphological, ultrastructural and immunocytochemical study. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 152-158, 2006.

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

MELO, F. P. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para detecção de *Schistosoma mansoni***. 2006. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MERINO, L. P.; MENDIETA-ECKERT, M.; MÉNDEZ-MAESTRO, I.; GARDEAZABAL, G. J. *Mycobacterium marinum* Infection in a Woman Taking Adalimumab. **Actas Dermo-sifiliograficas**, v. 111, n. 6, p. 525-526, 2020.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. ed. São Paulo: Gráfica Editora Michalany, 1990. p. 40-112.

MILLER, J. D.; NEELY, N. Large Scale Screen Highlights the Importance of Capsule for Virulence in the Zoonotic Pathogen *Streptococcus iniae*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 921-934, 2005.

MOOD, A. M.; GRAYBILL, F. A.; BOES, D. C. **Introduction to theory of statistics**. 3. ed. New York: Wiley & sons, p. 842. 1974.

MOURA, A.; HODON, M. A.; SOARES FILHO, P. M.; ISSA, M. A.; OLIVEIRA, A. P. F.; FONSECA JÚNIOR, A. A. Comparação de nove métodos de extração de DNA para o diagnóstico da tuberculose bovina por PCR em tempo real. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 7, p. 1223-1228, 2016.

MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. (2020). Disponível em: [dahttp://www.abc.gov.br/zopacas/informacoes/InstituicaoMPA.aspx](http://www.abc.gov.br/zopacas/informacoes/InstituicaoMPA.aspx). Acesso em: setembro de 2020.

NAKATANI, S. M.; BURGER, M.; ASSEF, M. C.; BROCKELT, S. R.; COGO, L. L.; MESSIAS-REASON, I. J. T. Efficient method for mycobacterial DNA extraction in blood cultures aids rapid PCR identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 11, p. 851-854, 2004.

NANO, F. E.; SCHMERK, C. The *Francisella* pathogenicity island. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1105, p. 122-137, 2007.

NANO, F. E.; ZHANG, N.; COWLEY, S. C.; KLOSE, K. E.; CHEUNG, K. K.; ROBERTS, M. J.; LUDU, J. S.; LETENDRE, G. W.; MEIEROVICS, A. I.; STEPHENS, G.; ELKINS, K. L. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 6430–6436, 2004.

NASSAR, A. F. C. **Padronização da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para identificação e diferenciação de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis***. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NGUYEN, V. V.; DONG, H. T.; SENAPIN, S.; GANGNONNGIW, W.; PIRARAT, N.; KAYANSAMRUAI, P.; RUNG-RUANGKIJKRAI, T.; RODKHUM C. Transmission of *Francisella noatuensis* subsp. *orientalis* from subclinically infected hybrid red tilapia broodstock (*Oreochromis* sp.) to their offspring. **Microbial Pathogenesis**, v. 136, 2019.

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

NOGA E. J.; WRIGHT J. F.; PASARELL, L. Some unusual features of mycobacteriosis in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 102, p. 335-344. 1990.



NOVOTNY, L.; DVORSKA, L.; LORENCOVA, A.; BERAN, V.; PAVLIK, I. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. **Veterinární Medicína**, v. 49, n. 9, p. 343-358, 2004.

OLINSKY, E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. **American Review of Respiratory Diseases**, v. 119, p. 107-159, 1979.

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

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, 2008. p. 73-94.

PÁDUA, S. B.; MARQUES, D. P.; SEBASTIÃO, F. A.; PILARSKI, F.; MARTINS, M. L.; ISHIKAWA, M. M. Isolation, characterization and pathology of *Citrobacter freundii* infection in native Brazilian catfish *Pseudoplatystoma*. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.7, n. 3, p. 151-157, 2014.

PARISOT, T. J.; DECKER, A. H. A comparative study of the causative agent of a mycobacterial disease of salmonoid fishes. I. A comparison of the staining characteristics of the fish disease with human tuberculosis in sections stained by the Fite-Faraco and Ziehl-Neelsen methods. **American Review of Respiratory Diseases**, v. 81, p. 60-67, 1960.

PATE, M.; JENCIC, V.; ZOLNIR-DOVC, M.; OCEPEK, M. Detection of mycobacteria in aquarium fish in Slovenia by culture and molecular methods. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 64, n. 1p. 29-35, 2005.

PICKEN, M. M.; PICKEN, R. N.; HAN, D.; CHENG, Y; STRLE, F. Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 15, n. 6, p. 489- 498, 1996.

PILLAY, T. V. R.; KUTTY, M. N. **Aquaculture: Principles and Practices**. 2. Ed. v. 15, 2005. p. 624,2005.

PIRARAT, N.; KOBAYASHI, T.; KATAGIRI, T.; MAITA, M.; ENDO, M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 339-34, 2006.

PLUMP, J. A.; HANSON, L. A. **Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes**. 3rd.Ed. New Delhi, India: Blackwell. 2011.

POUDYAL, S.; PULPIPAT, T.; WANG, P-C.; CHEN, S-C.; Comparison of the pathogenicity of *Francisella orientalis* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), Asian seabass (*Lates calcarifer*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*) through experimental intraperitoneal infection. **Journal of Fish Diseases**, v. 43, p. 1097-1106, 2020.

PRUDENT, E.; LEPIDI, H.; ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. *In situ* Hybridization (FISH) and Peptide Nucleic Acid Probe-Based FISH for Diagnosis of Q Fever Endocarditis and Vascular Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 9, 2018.

PULKKINEN, K.; SUOMALAINEN, L. R.; READ, A. F.; EBERT, D., RINTAMAKI, P.; VALTONEN, E. T. Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnar is disease in Finland. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1681, p. 593–600, 2009.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Gênero *Francisella*** In: Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.149-151.

RAGHIANTE, F.; FERRASSO, M. M.; RODRIGUES, M. V.; BIONDI, G. F.; MARTINS, O. A. *Francisella* spp. em tilápias no Brasil: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 1, p. 120-131, 2017.

ROBERTS, R. J.; RODGER, H. D. **The pathophysiology and systematic pathology of teleosts**. In: ROBERTS, R. J. Fish pathology. 4. Ed. Wiley-blackwell, 2012. 581 p.

ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behavior of melanocytic tumours in cats and dogs. **Journal of Comparative Microbiology**, v. 121, p. 13-24, 1999.

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

ROMANO, L. A.; KLOSTERHOFF, M. C.; DE MEDEIROS, A. F. F.; PEDROSA, V. F. Comparative Study of Ziehl Neelsen's Technique and the Fite-Faraco Technique in the Histopathological Diagnosis of Mycobacteriosis in Fish. **Asian Journal of Research in Animal and Veterinary Sciences**, v. 6, n. 1, p. 27-34, 2020.

ROTH, A.; REISCHL, U.; STREUBEL, A.; NAUMANN, L.; KROPPESTEDT, R. M.; HABICHT, M.; FISCHER, M.; MAUCH, H. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction end of nucleases. **Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1094-1104, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHES, E. G.; CERQUEIRA, V.R. Refrigerated storage of lane snapper *Lutjanus synagris* sperm. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, p. 293-305, 2010.

SANCHES, E. G.; OLIVEIRA, I. R.; SERRALHEIRO, P. C.; CERQUEIRA, V. R. Cryopreservation of mutton snapper (*Lutjanus analis*) sperm. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p. 1083-1091, 2013.

SANDHIKA, W., ADRIATY, D., AGUSNI, I. Detection of *Mycobacterium leprae* in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Sample by Fite-Faraco Staining and Polymerase Chain Reaction. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 231–236, 2016.

SANTIC, M.; MOLMERET, M.; KLOSE, K. E.; JONES, S.; KWAIK, Y. A. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 969-979, 2005.

SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A. R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER, P.; LAWRENCE, R. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v. 34, p. 1215-1226, 2008.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Anal Biochem**, v.15, p. 354-311, 2006.

SCHULTER, E. P., VIEIRA FILHO, J. E. R. **Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de Tilápia**. Texto para discussão/Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada- Brasília. Ipea, Rio de Janeiro. 2017.

SEBRAE – SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Aquicultura no Brasil** – Série Estudos Mercadológicos. Natal: Sebrae, 2015.

SHAH, D. H.; VERMA, R.; BAKSHI, C. S.; SINGH, R. K. A multiplex PCR for the differentiation of *M. bovis* and *M. tuberculosis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 39-43, 2002.

SHAHIN, K.; SHINN, A. P.; METSELAAR, M.; RAMIREZ-PAREDES, J. G.; MONAGHAN, S. J.; THOMPSON, K. D.; HOARE, R.; ADAMS, A. Efficacy of an inactivated whole-cell injection vaccine for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L) ,against multiple isolates of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from diverse geographical regions. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 89, p. 217-227, 2019.

SHIBATA, D. Preparation of nucleic acids from archival material. In: MULLIS, K. B.; FERRE, F.; GIBBS, R. A. (Eds.). **The polymerase chain reaction**. Boston: Birkhauser, 1994, p. 47- 54.

SLANY, M.; JEZEK, P.; BODNAROVA, M. Fish tank granuloma caused by *Mycobacterium marinum* in two aquarists: Two case reports. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 161329, 2013.

SOTO, E.; ABRAMS, S.; REVAN, F. Effects of temperature and salt concentration on *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* infections in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 101, p. 217–23. 2012.

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

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

SOTO, E.; KIDD, S.; MENDEZ, S.; MARANCIK, D.; REVAN, F.; HILTCHIE, D.; CAMUS, A. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* pathogenesis analyzed by experimental immersion challenge in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 1-2, p. 77-84, 2013.

SOTO, E.; SHAHIN, K.; TALHAMI, J. J.; GRIFFIN, M. J.; ADAMS, A.; RAMÍREZ-PAREDES, J. G.; Characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* farmed in Lake Yojoa, Honduras. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 133, n. 2, p. 141-145, 2019.

SOTO, E.; ZAYAS, M.; TOBAR, J.; ILLANES, O.; YOUNT, S.; FRANCIS, S.; DENNIS, M. M. Laboratory-controlled Challenges of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: Comparisons between Immersion, Oral, Intracoelomic and Intramuscular Routes of Infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, n. 4, p. 339-345, 2016.

SPICKLER, A. R. Mycobacteriosis. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>, 2006. Acesso em: setembro. 2020.

SRIDHAR, S.; SHARMA, A.; KONGSHAUG, H.; NILSEN, F.; JONASSEN, I. Whole genome sequencing of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* gives novel insights into *Francisella* evolution and pathogenicity. **BMC Genomics**, v. 13, p. 598, 2012.

SUAREZ, R.; KUSCH, K.; MIRANDA, C.D.; LI, T.; CAMPANINI, J.; BEHRA, P. R. K.; ARO, L.; MARTÍNEZ, A.; GODOY, M.; MEDINA, D.A. Whole-Genome sequencing and comparative genomics of *Mycobacterium* spp. from farmed Atlantic and coho salmon in Chile. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 114, n. 9, p. 1323-1336, 2021.

SUI, W.; OU, M.; CHEN, J.; WAN, Y.; PENG, H.; QI, M.; HUANG, H.; DAI, Y. Comparison of immuno histochemistry and fluorescence in situ hybridization assessment for Her-2 status in breast cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v.7, p.83, 2009.

TAMURA K.; STECHER G.; KUMAR S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**. 2021.

TANG, W.; HU, J.; ZHANG, H.; WU, P.; HE, H. Kappa coefficient: a popular measure of rater agreement. **Shanghai Arch Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 62-67, 2015.

TOMASO, H.; KATTAR, M.; EICKHOFF, M.; WERNERY, U.; AL DAHOUK, S.; STRAUPE, E.; NEUBAUER, E.; SCHOLZ, H. C. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of Brucellae in tissue using quantitative real-time PCR. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 100, 2010.

VINCENT, V.; BROWNELLIOTT, B.; JOST, K. JR.; WALLACE, R. JR. **Mycobacterium: phenotypic and genotypic identification**. Manual of clinical microbiology. 8. ed. Washington (DC): ASM Press, 2003.

WANG, X.; WANG, Q.; XIAO, J.; LIU, Q.; WU, H.; XU, L.; ZHANG, Y. *Edwardsiella tarda* T6SS component evpP is regulated by esrB and iron and plays essential roles in the invasion of fish. **Fish Shellfish Immunology**, v. 27, p. 469-477, 2009.

WAYNE, L. G.; KUBICA, G. P. **Mycobacteria**. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. Bergey's manual of systematic bacteriology. 8. Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2. p. 1435-1437.

WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WHIPPS, C. M.; LIEGGI, C.; WAGNER, R. Mycobacteriosis in zebrafish colonies. **ILAR Journal**, v. 53, n. 2, p. 95-105, 2012.

WHIPPS, C. M.; WATRALL, V. G.; KENT, M. L. Characterization of a *Mycobacterium* sp. in rockfish, *Sebastes alutus* (Gilbert) and *Sebastes reedi* (Westrheim & Tsuyuki), using rDNA sequences. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, n. 4, p. 241-245, 2003.

WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, M. W.; KONEMAN, E. W.; PROCOP, G. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. In: Bacilos Gram-negativos exigentes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 423-543.

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

XU, D. H.; SHOEMAKER, C. A.; KLESIOUS, P. H. Evaluation of the link between gyrodactylosis and streptococcosis of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 30, n. 4, p. 233-238, 2007.

YANONG, R. P. E.; POWDER, D. B. Association of Mycobacteria in Recirculating Aquaculture Systems and Mycobacterial Disease in Fish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 22, n. 4, p. 219-223, 2010.

ZERIHUN, M. A.; NILSEN, H.; HODNELAND, S.; COLQUHOUN, D. J. *Mycobacterium salmoniphilum* infection in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 34, p. 769-781, 2011.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1 – Certificado CETEA



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO BIOLÓGICO**

*COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IB*

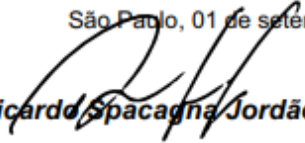
---

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 169/20** sobre o Projeto: **“Investigação de agentes bacterianos (*Mycobacterium spp.* e *Francisella spp.*) causadores de doenças granulomatosas em pisciculturas comerciais de água doce e marinha no sudeste do Brasil”**, sob a responsabilidade de **Alessandra Figueiredo de Castro Nassar**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCAs).

Protocolo aprovado pela *CEUA-IB* em 01 de setembro de 2020.

São Paulo, 01 de setembro de 2020

  
**Ricardo Spacagna Jordão**  
Coordenador da *CEUA-IB*

## 9.2. Anexo 2 - POP Coleta

### KIT DE COLETA

Cada kit é composto de:



FRASCO COLETOR 40 mL



2x MICROTUBOS 2 mL



TUBO DE ENSAIO COM 3 mL DE MEIO BHI

**FRASCOS COLETORES 40 ml:** coleta de fragmentos de fígado, rim, baço e brânquias para histologia.

**MICROTUBOS 2 ml:** coleta de fragmentos de fígado, rim, baço, brânquias e lesão de pele, (quando houver). Dividir entre dois microtubos: um para o isolamento de *Mycobacterium* spp. e outro para microscopia eletrônica (fragmento bem pequeno).

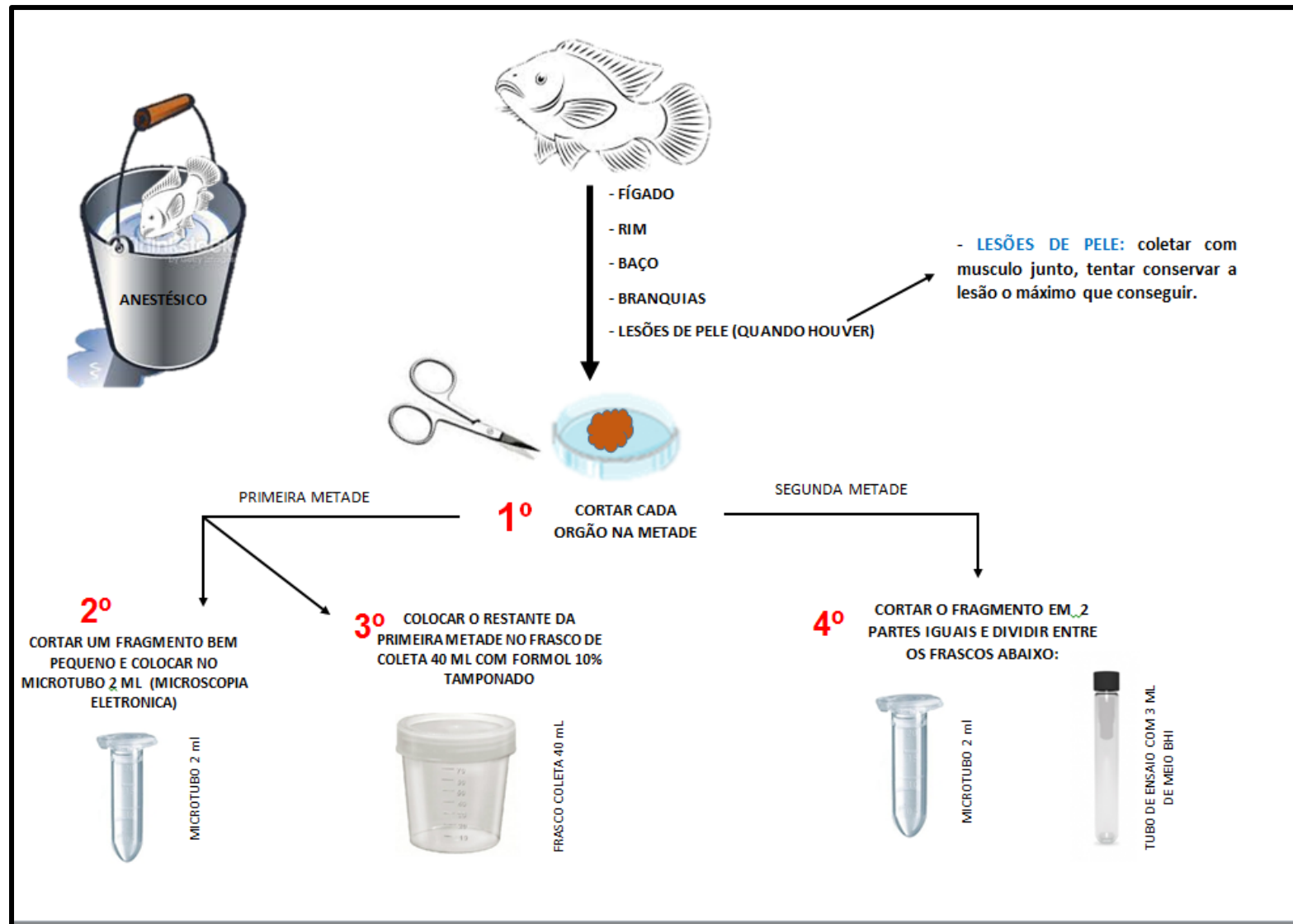
**TUBO DE ENSAIO COM 3 ml DE MEIO BHI:** Tubos com meio de cultura BHI para coleta de fragmentos de fígado, rim, baço e lesão de pele, (quando houver).

### PROCEDIMENTO DA COLETA

- 1- Pegar o kit de coleta;
- 2- Submergir o peixe no anestésico (benzocaina);
- 3- Retirar o peixe do anestésico, **pesar, medir** e eutanasiar por dissecação da medula.
- 4- Realizar a necropsia do peixe e descrever qualquer anomalia macroscópica;
- 5- Coletar lesão de pele quando houver;
- 6- Coletar fígado, rim, baço e brânquias e dispor na placa de Petri;
- 7- Cortar cada órgão pela metade. Primeira metade tirar um fragmento bem pequeno e adicionar no **microtubo 2ml** e o restante adicionar no **frasco de coleta de 40 ml**. A segunda metade dividir em 2 partes iguais. Uma parte para o **microtubo 2ml** e uma parte para o **tubo de ensaio contendo 3 ml de meio BHI**.
- 8- Congelar os **microtubos** imediatamente;
- 9- Descartar o peixe e arrumar a bancada para o próximo peixe.



Junto com o POP foi disponibilizado um esquema (Organograma) para facilitar a equipe de coleta com o procedimento.



**Organograma.** Esquema para a coleta de material em campo.



