

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

Francisella noatunensis subsp. *orientalis*: culturabilidade e resposta *in vitro* de leucócitos isolados de tilápia-do-nilo

Crystal Lodi Conde

Orientador: Dr. Leonardo Tachibana

Co-orientadora: Dra. Danielle de Carla Dias

São Paulo

2022

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

Crystal Lodi Conde

Orientador: Dr. Leonardo Tachibana

Co orientadora: Dra. Danielle de Carla Dias

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

C749f Conde, Crystal Lodi

Francisella noatunensis subsp. orientalis: culturabilidade e resposta *in vitro* de leucócitos isolados de tilápia-do-nilo / Crystal Lodi Conde – São Paulo, 2022
v; 35f.; fig.; tab.; graf.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA – Secretaria de Agricultura e
Abastecimento.

Orientador: Dr. Leonardo Tachibana. Coorientadora: Dra. Danielle de Carla Dias

1. Franciselose 2. Microbiologia 3. Meios de cultivo 4. Criopreservação 5. Cultivo celular
I. Tachibana, Leonardo. II. Título.

CDD 571.6

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por me apoiar nesta empreitada e mesmo de longe, sempre torcendo pelo meu sucesso.

Ao meu orientador Leonardo Tachibana, pela oportunidade e conhecimento. À Maria José Tavares Ranzani pela oportunidade de participação em seu projeto. Ao Vander Bruno dos Santos, pela ajuda e apoio na análise estatística. À Danielle de Carla Dias pelo apoio, ajuda, oportunidades e companheirismo.

Aos amigos Túlio Teruo Yoshinaga e Luara Lucena Cassiano obrigado pela confiança e acreditarem no meu esforço.

Formatado: Recuo: Primeira linha:
0 cm

Aos meus amigos de laboratório Jessyca Ellen Alexandre, Gustavo Augusto Braz Vargas, Guilherme Nunes Ferrez, Carlos Ishikawa, Erna Elisabeth Bach. Obrigada pelo apoio e ajuda ao longo desses dois anos.

Ao Caio da Silva Miranda que sempre me ajudou e apoiou, além de me incentivar.

À Beatriz Pacheco Nogueira Oliveira por todo apoio, companheirismo, conselhos e pela amizade.

À Thaís Tiemi Yoshinaga pela disponibilidade e ajuda ao longo do projeto.

Aos professores Antonelli Nicole e Luiz Mello pelo estímulo, treinos e motivação.

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca SP pela oportunidade de realizar o mestrado, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v

Formatado: Justificado, Recuo: À esquerda: 4,99 cm

INTRODUÇÃO GERAL.....	6
REFERÊNCIAS.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 Cultivo da bactéria.....	19
2.2 PCR convencional.....	19
2.3 Ensaio I - Otimização do cultivo da bactéria.....	19
2.4 Ensaio II - Técnicas de preservação e armazenamento de cepas de <i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>orientalis</i>	20
2.5 Ensaio III - Proliferação de leucócitos <i>in vitro</i>	20
2.6 Análises estatísticas.....	21
3. RESULTADOS.....	22
4. DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERÊNCIAS.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1- Resultado da eletroforese em gel de agarose (2,4%) dos produtos de DNA amplificados por PCR a partir de colônias isoladas de <i>Francisella noatunensis subsp. orientalis</i>	23
Figura 2- Avaliação da densidade óptica do desempenho do cultivo bacteriano em diferentes horas, concentrações e tipos de soro.....	24
Figura 3- Contagem da FNO absoluta em câmara de Neubauer de diferentes tipos e concentrações de soro.....	25
Figura 4- Resultado da eletroforese em gel de agarose (2,4%) dos produtos de DNA amplificados por PCR a partir de extração de DNA das amostras da otimização do cultivo da FNO.....	26
Figura 5- Diferença entre as concentrações de glicerol pelo método de criopreservação após 1 dia.....	27
Figura 6- Diferença entre as diferentes temperaturas e concentrações de glicerol pelo método de criopreservação após 7 dias.....	28
Figura 7- Resultado da eletroforese em gel de agarose (2,4%) dos produtos de DNA amplificados por PCR a partir de extração de DNA das amostras da criopreservação	29
Figura 8- Proliferação de leucócitos em cultivo celular por citometria de fluxo após a incubação com diferentes concentrações de bactérias.....	30

RESUMO

O contínuo crescimento da produção aquícola tem resultado também no aumento da incidência e severidade de surtos infecciosos na aquicultura. A *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (FNO) é uma bactéria Gram negativa, com formato de cocobacilo, com característica fastidiosa e causadora da franciselose, doença que afeta principalmente cultivos de tilápia-do-nylo durante baixas temperaturas. Devido à dificuldade na prevenção e tratamento desta doença, objetivou-se otimizar as condições de cultivo, preservação da FNO, além de avaliar os efeitos da bactéria inativada sobre a proliferação de leucócitos *in vitro*. As Cepas de FNO (0012018 - Prevet laboratórios, Jaboticabal - SP, Brasil) foram cultivadas em meio de cultura Muller-Hinton com Soro fetal bovino (SFB) e soro sanguíneo de tilápia-do-nylo (ST) nas concentrações de 3% e 10%, incubados em estufa B.O.D na temperatura de 25°C. O crescimento foi avaliado após 12, 24, 48 e 72h de cultivo por meio de contagem em câmara de Neubauer e determinação da turbidez em espectrofotômetro. Em seguida, as FNO foram cultivadas em SFB e ST e criopreservadas em 20%, 30% e 50% de glicerol, sendo armazenadas em diferentes temperaturas (-20, -80 e -196°C). Após um e sete dias de congelamento, as bactérias foram descongeladas e cultivadas e, seu crescimento foi avaliado pela contagem em câmara de Neubauer. Para a avaliação da proliferação de leucócitos *in vitro*, essas células foram isoladas do baço, fígado, e rim cranial e incubados cultivados com diferentes concentrações de FNO inativadas por formol a 0,3%. Diferentes concentrações de FNO foram avaliadas (10^6 , 10^5 , 10^4 células/ μ L). Os resultados demonstraram que o cultivo da FNO nos diferentes tipos de soro apresentou maior contagem de bactérias ($p < 0,05$), após 12h de cultivo, no tratamento contendo 10% de SFB em relação aos outros tratamentos. Após 72h, não houve diferenças significativas na contagem de FNO ($p > 0,05$). Na criopreservação o melhor desempenho de crescimento da FNO foi com o meio de cultura contendo ST e 30% de glicerol. Neste estudo, foi observado que foi possível o cultivo da bactéria em ST, com a mesmo crescimento medido após 72h. O cultivo celular de leucócitos *in vitro* juntamente com a FNO inativada em formaldeído promove a proliferação de mais leucócitos. Estes resultados têm grande importância na otimização de cultivo da FNO.

Palavras-chave: Franciselose, microbiologia, meios de cultivo, criopreservação, cultivo celular.

ABSTRACT

The expansion of global fish aquaculture in 2018 reached about 46% of total production and it is natural that its intensification will result in the expansion of infectious agents and diseases in aquaculture. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (FNO) is a gram-negative, coccobacillus-shaped, fastidious bacterium that causes francisellosis, a disease that mainly affects tilapia crops during low temperatures. Thus, this work aimed to evaluate the FNO cultivations and cryopreservation conditions, replacing fetal bovine serum (SFB) with tilapia blood serum (ST), in addition to evaluating the *in vitro* leukocytes proliferation triggered by inactivated FNO strains (0012018 Prevet laboratory, Jaboticabal-SP, Brazil) were cultivated Muller-Hinton medium with FBS and Nile tilapia blood serum (T) at concentrations of 3% and 10% at 25°C. FNO growing was evaluated after 12, 24, 48 and 72h of culture by counting in a Neubauer chamber and measured by spectrophotometer. Then, FNO stock solution were cultured in FBS and ST and cryopreserved in 20%, 30% and 50% glycerol; stored at -20, -80 and -196.15°C. After one and seven days of freezing, the FNO were cultivated, and their growth was evaluated by counting in a Neubauer chamber. For the evaluation of leukocyte proliferation *in vitro*, leukocytes were isolated from the spleen, liver, and head kidney and cultured with different concentrations of FNO inactivated by 0.3% formalin. Different FNO concentrations were evaluated (10^6 , 10^5 , 10^4 cells/ μ L). The results indicated that the culture in the different types of serum had no significant differences between treatments after 72 hours, however, the FNO counting showed that after 12 hours of culture in a higher concentration of FBS, a high number of cells/ μ L was counted. In cryopreservation, the best performance was the ST with 30% glycerol. In this study, we demonstrated increase in serum concentration in the culture medium increases the growth of FNO and when cell culture of the inactivated bacteria is carried out, there is proliferation of leukocytes in the cranial kidney and spleen. These results are important to optimize the FNO cultivation.

Keywords: Francisellosis, microbiology, culture medium, cryopreservation, cell culture.

1 INTRODUÇÃO GERAL

2
3 A produção global de peixes em 2018 foi de aproximadamente 179 milhões de
4 toneladas com valor comercial estimado em USD 401 bilhões, dos quais USD 250 bilhões são
5 provenientes da aquicultura, correspondendo a 46% da produção total. (FAO, 2020). No ano
6 de 2021, o Brasil registrou uma produção aquícola total de 841.005 toneladas, um aumento de
7 4,7% em relação ao ano anterior (PEIXE BR, 2022). Dessa forma, é natural que a intensificação
8 dos métodos produtivos resultem na expansão e desenvolvimento de novos agentes
9 infecciosos e doenças na aquicultura (RODRIGUES et al., 2018).

10 Entre as doenças infecciosas presentes na aquicultura, cerca de 55% são causadas por
11 bactérias, onde o meio aquático favorece o desenvolvimento de microrganismos.
12 (MARTÍNEZ et al., 2021). Recentemente, as bactérias do gênero *Francisella* emergiram como
13 patógenos severos na aquicultura em diversas espécies no mundo (SOTO et al., 2013b;
14 SOTO; ENDRIS; HAWKE, 2010). A *Francisella sp.* é uma bactéria intracelular facultativa
15 capaz de infectar e se replicar em células do sistema imunológico, principalmente,
16 macrófagos e células dendríticas, causando a franciselose (COLQUHOUN, 2011; SOTO,
17 2010).

18 A franciselose tem sido associada como uma das principais causas de mortalidade
19 em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em países como Noruega, Estados Unidos, Chile,
20 Costa Rica, Japão e Taiwan (MAUEL, 2007; SOTO, 2009). No Brasil, a franciselose foi
21 diagnosticada pela primeira vez em 2016, no estado de Minas Gerais, onde houve aumento
22 progressivo da mortalidade dos peixes (JATOBÁ; KLIPP; HOPPE, 2016).

23 Animais infectados com *Francisella sp.* podem apresentar granulomas nos órgãos
24 viscerais, especialmente em órgãos hematopoiéticos, como rim cranial e baço, podendo
25 também ser encontrados no coração e fígado (SHAHIN, 2020). Com vários órgãos
26 comprometidos, os peixes acometidos pela *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (FNO)
27 apresentam altas taxa de mortalidade na forma aguda, apresentando sinais clínicos
28 inespecíficos como anorexia, exoftalmia, distensão ventral, ascite, coloração escura, anemia,
29 brânquias hemorrágicas, excesso de muco, comportamento letárgico e natação errática
30 (RAMIREZ, 2015; SOTO, 2010, 2013^a).

31 A FNO possui estratégias que a permitem driblar os sistema imune dos peixes dos
32 peixes, possibilitando sua sobrevivência frente às substâncias do interior dos fagolisossomos
33 após sua fagocitose (BAKKEMO, 2011; BIRKBECK, 2011; CLEMENS, 2004; SANTIC, 2005).

34 Na falha da resposta imunológica primária, na tentativa de eliminar o patógeno, as
35 células infectadas são envoltas por uma cápsula fibrosa e espessa, chamada de granuloma,
36 sendo possível sua observação macroscopicamente (MARTÍNEZ, 2021; SOTO, 2013c). Com a
37 cronificação da doença, ocorre a replicação das bactérias encapsuladas e, em seguida, a
38 ruptura do granuloma com disseminação das bactérias, causando mais danos ao tecido
39 (MARTÍNEZ et al., 2021).

40 O uso de antibióticos é a opção mais utilizada em diversos cenários de infecções
41 bacterianas (BOTELHO, 2015). No Brasil, os antibióticos disponíveis para o uso na
42 aquicultura, a oxitetraciclina e o florfenicol, apresentaram resultados positivos no tratamento
43 da franciselose em tilápias-do-nilo. Em contrapartida, o uso de antibióticos tem sido
44 associado à proliferação de bactérias resistentes e contaminação do meio ambiente
45 (BOTELHO, 2015), o que estimulou a procura de alternativas para prevenção e controle da
46 doença. Logo, o desenvolvimento de vacinas é uma opção promissora na prevenção de
47 bacterioses em peixes, reduzindo consideravelmente as perdas econômicas (WANG et al.,
48 2013).

49 Pela ação intracelular da FNO, a franciselose é de difícil diagnóstico e tratamento
50 (SOTO et al., 2009), sendo a realização de necrópsias uma ferramenta comumente utilizada
51 para diagnóstico. Os achados patológicos mais comuns são órgãos com aumento de volume,
52 aspecto hemorrágico, podendo apresentar nódulos no baço, rins, fígado e brânquias
53 (RAMIREZ et al., 2015). Metodologias moleculares e histológicas foram aplicadas com
54 sucesso em um estudo onde um acervo de 68 tecidos de diferentes espécies de peixes foram
55 coletados de diferentes localizações geográficas entre 2000 e 2009 (SOTO et al., 2009), sendo
56 observado nas análises histológicas presença multifocal de lesões granulomatosas com
57 presença de inúmeros cocobacilos.

58 No estudo realizado por SOTO (2009), realizou-se o isolamento primário da bactéria
59 utilizando dois tipos de ágar: meio *Cystine Heart Agar* com 0,1% de cistina, suplementado
60 com 3% de soro fetal bovino. No Brasil, é comum o cultivo de FNO com meio Ágar Muller-
61 Hinton (MH) (Difco™), contendo soro fetal bovino (3%), glicose (1%) e cloreto de L-cisteína
62 (0,1%) (ALARCON et al., 2019^a). Posteriormente, é necessário o armazenamento correto para
63 preservação destes microrganismos.

64 O método de criopreservação é utilizado para reduzir o metabolismo e a deterioração
65 (CASTRO, 2011). Há inúmeros agentes crioprotetores, porém, o glicerol é o mais utilizado
66 (AGUIAR et al., 2012).

67 Com base nas considerações acima, este trabalho visa otimizar condições de cultivo e
68 criopreservação da *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, além de avaliar os efeitos da
69 bactéria inativada sobre a proliferação de leucócitos isolados de tilápia-do-nilo, *in vitro*.

70 No capítulo 1 será apresentado o artigo intitulado “*Francisella noatunensis* subsp.
71 *orientalis*: culturabilidade e resposta *in vitro* de leucócitos isolados de tilápia-do-nilo” a ser
72 enviado para revista Fish and Shellfish Immunology.

73 REFERÊNCIAS

74 AIYAR, P.; SCHAEME, D.; GARCÍA-ALTARES, M.; FLORES, F. D.; DATHE, H.;
75 HERTWECK, C.; SASSO, S.; MITTAG, M. Antagonistic bacteria disrupt calcium homeostasis
76 and immobilize algal cells. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1-12, 2017. DOI:
77 10.1038/s41467-017-01547-8.

78 ARAUJO, D. M.; PEZZATO, A. C.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; NAKAGOME, F.
79 K. Hematologia de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas
80 pelo frio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 294-302, 2011. DOI:
81 10.1590/S0100-204X2011000300010.

82 AGUIAR, A. D. F. T. D.; FÁTIMA, M.; TEIXEIRA, S.; TELES, H. D. A. Carlos;
83 MARTINS, G. R.; QUIRINO, R.; JÚNIOR, B. A.; COSTA, C. Edmara. Princípios básicos da
84 criomicrobiologia: Enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes
85 crioprotetores [Basic principles of criomicrobiologia: focus in kind of microorganisms and
86 principals cryoprotectants agents] **Acta Veterinaria Brasilica**, v. [s.l.: s.n.].

87 BAKKEMO, K. R.; MIKKELSEN, H.; BORDEVIK, M.; TORGERSEN, J.; WINTHER-
88 LARSEN, H. C.; VANBERG, C.; OLSEN, R.; JOHANSEN, L. H.; SEPPOLA, M. Intracellular
89 localisation and innate immune responses following *Francisella noatunensis* infection of
90 Atlantic cod (*Gadus morhua*) macrophages. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 31, n. 6,
91 p. 993-1004, 2011. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.08.020.

92 BIRKBECK, T. H.; FEIST, S. W.; VERNER-JEFFREYS, D. W. *Francisella* infections in

93 fish and shellfish. **Journal of Fish Diseases**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 173-187, 2011. DOI:
94 10.1111/j.1365-2761.2010.01226.x.

95 BOTELHO, A H.;MOURAD, M N N.; FERREIRA, E M D S P A.; LEIRA, HMatheus;
96 MELO, C V Carlos. *FRANCISELLA* sp. – UMA REVISÃO. **Revista Científica De Medicina**
97 **Veterinária**, [S. l.], v. 25, p. 1679-7353, 2015.

98 CARVALHO, P L. P. F.; YAMAMOTO, F Y.; BARROS, M M.; GATLIN, D M. L-
99 glutamine in vitro supplementation enhances Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus,
100 1758) leukocyte function. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 80, n. June, p. 592-599,
101 2018. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.06.043.

102 CASTRO, K S D.; FUGIMURA, M. S.; VAZ, L J.; MARCUSSO, P F. Estabilidade das
103 variáveis hematológicas em sangue de *Colossoma macropomum* armazenado com diferentes
104 anticoagulantes. [S. l.], p. 171-180, 2020.

105 CASTRO, S V.; CARVALHO, A D A.; DA SILVA, C M G.; FAUSTINO, L R; DA
106 FIGUEIREDO, J R; RODRIGUES, A P R. Agentes crioprotetores intracelulares: características
107 e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.
108 l.], v. 39, n. 2, p. 1-18, 2011.

109 CLEMENS, D L.; LEE, B Y; HORWITZ, M A. Virulent and avirulent strains of
110 *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape
111 into the cytoplasm in human macrophages. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 72, n. 6, p.
112 3204-3217, 2004. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3204-3217.2004.

113 COLQUHOUN, D J.; DUODU, Sl. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic
114 organisms. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 1-15, 2011. DOI: 10.1186/1297-9716-42-
115 47.

116 DIAS, M K R. Uso de imunoestimulantes no desempenho , fisiologia e imunidade de
117 alevinos de *Arapaima gigas* (Arapaimidae). [S. l.], v. 1822, p. 1-61, 2016.

118 FAO. **The State of Food and Agriculture 2020**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.4060/cb1447en.

119 ALARCON, F M. F. et al. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged infection by

120 *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* via an intragastric route protocol. **Aquaculture**, [S. l.],
121 v. 510, n. November 2018, p. 380–385, 2019. a. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.06.007.

122 ALARCON, F M. F. et al. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged infection by
123 *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* via an intragastric route protocol. **Aquaculture**, [S. l.],
124 v. 510, n. June, p. 380–385, 2019. b. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.06.007.

125 HSIEH, C. Y.; TUNG, M. C.; TU, C.; CHANG, C. D.; TSAI, S. S. Enzootics of visceral
126 granulomas associated with Francisella-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.).
127 **Aquaculture**, [S. l.], v. 254, n. 1–4, p. 129–138, 2006. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.044.

128 JATOBÁ, A; KLIPP, S P; HOPPE, R. Primeiro relato de *Francisella noatunensis* subesp.
129 *orientalis* no sul do Brasil – Relato de caso. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 172,
130 2016. DOI: 10.21708/avb.2016.10.2.5512MARTÍNEZ-L., P.;

131 MARTÍNEZ P, M.; GOLLAS G, T.; HERNÁNDEZ L, J.; ROBLES P, G R.
132 Granulomatosis in fish aquaculture: a mini review. **Reviews in Aquaculture**, [S. l.], v. 13, n.
133 1, p. 259–268, 2021. DOI: 10.1111/raq.12472.

134 MAUEL, M. J.; SOTO, E.; MORALIS, J. A.; HAWKE, J. A Piscirickettsiosis-like
135 syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic
136 agent. **Journal of Aquatic Animal Health**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 27–34, 2007. DOI:
137 10.1577/H06-025.1.

138 NGUYEN, V V.; DONG, H T.; SENAPIN, S.; PIRARAT, N. *Francisella noatunensis*
139 subsp . *orientalis* , an emerging bacterial pathogen affecting cultured red tilapia (*Oreochromis*
140 sp .) in Thailand *Francisella noatunensis* subsp . *orientalis* , an emerging bacterial pathogen
141 affecting cultured red tilapia (*Oreochr.* [S. l.], n. February 2018, 2015. DOI:
142 10.1111/are.12802.

143 PEIXE BR. Peixe BR da Piscicultura. **Anuario 2022**, [S. l.], p. 1-140, 2022.

144 PULPIPAT, T.; MAEKAWA, S.; WANG, Pi C.; CHEN, S C. Immune responses and
145 protective efficacy of a formalin-killed *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* vaccine
146 evaluated through intraperitoneal and immersion challenge methods in *oreochromis*
147 *niloticus*. **Vaccines**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 1–14, 2020. DOI: 10.3390/vaccines8020163.

148 RAMIREZ-P, Jo G. The fish pathogen *Francisella orientalis*: characterisation and
149 vaccine development. [S. l.], n. April, p. 1-263, 2015. Disponível em:
150 http://dspace.stir.ac.uk/handle/1893/21822?mode=full#.Wi6_5bacaxM.

151 RODRIGUES, M V; FRANCISCO, C J.; DAVID, G S.; DA SILVA, R J.; FALCONE-
152 DIAS, M F.; JÚNIOR, J P A. Monitoring of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in farmed
153 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Aquaculture International**, [S. l.], v. 26, n. 1, p.
154 127-138, 2018. DOI: 10.1007/s10499-017-0204-4. Disponível em:
155 <http://link.springer.com/10.1007/s10499-017-0204-4>.

156 SANTIC, M.; MOLMERET, M.; KLOSE, K E.; JONES, S.; ABU KWAIK, Y. The
157 *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IgIC and its regulator MgIA are essential
158 for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm.
159 **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 969-979, 2005. DOI: 10.1111/j.1462-
160 5822.2005.00526.x.

161 SHAHIN, K.; PIREZAN, F.; ROGGE, M.; LAFRENTZ, B R.; SHRESTHA, R P.;
162 HILDEBRAND, M.; LU, F.; HOGENESCH, H.; SOTO, E. Development of *IgIC* and *GroEL*
163 recombinant vaccines for francisellosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and**
164 **Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 105, n. April, p. 341-349, 2020. DOI:
165 10.1016/j.fsi.2020.07.045.

166 SHAHIN, K.; SHINN, A P.; METSELAAR, M.; RAMIREZ-P, J G; MONAGHAN, S J.;
167 THOMPSON, K D.; HOARE, R.; ADAMS, A. Efficacy of an inactivated whole-cell injection
168 vaccine for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L), against multiple isolates of *Francisella*
169 *noatunensis* subsp. *orientalis* from diverse geographical regions. **Fish and Shellfish**
170 **Immunology**, [S. l.], v. 89, n. April, p. 217-227, 2019. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.03.071.

171 SOTO, E.; HAWKE, J. P.; FERNANDEZ, D.; A MORALES, J. *Francisella sp.*, an
172 emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. **Journal of Fish**
173 **Diseases**, [S. l.], v. 32, n. 8, p. 713-722, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2009.01070.x.

174 SOTO, E.; KIDD, S.; GAUNT, P. S.; ENDRIS, R. Efficacy of florfenicol for control of
175 mortality associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in Nile tilapia, *Oreochromis*
176 *niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 411-418, 2013. a. DOI:

177 10.1111/j.1365-2761.2012.01425.x.

178 SOTO, E.; ENDRIS, R G.; HAWKE, John P. In vitro and in vivo efficacy of florfenicol
179 for treatment of *Francisella asiatica* infection in tilapia. **Antimicrobial Agents and**
180 **Chemotherapy**, [S. l.], v. 54, n. 11, p. 4664–4670, 2010. DOI: 10.1128/AAC.00206-10.

181 SOTO, E.; KIDD, S.; MENDEZ, S.; MARANCIK, D.; REVAN, F.; HILTCHIE, D.;
182 CAMUS, A. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* pathogenesis analyzed by experimental
183 immersion challenge in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Veterinary Microbiology**, [S.
184 l.], v. 164, n. 1–2, p. 77–84, 2013. b. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.01.024.

185 SOTO, E.; KIDD, S.; MENDEZ, S.; MARANCIK, D.; REVAN, F.; HILTCHIE, D.;
186 CAMUS, A. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* pathogenesis analyzed by experimental
187 immersion challenge in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Veterinary Microbiology**, [S.
188 l.], v. 164, n. 1–2, p. 77–84, 2013. c. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.01.024. Disponível em:
189 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.024>.

190 SOTO, E.; WILES, J.; ELZER, P.; MACALUSO, K.; HAWKE, J P. Attenuated *Francisella*
191 *asiatica* *iglC* mutant induces protective immunity to francisellosis in tilapia. **Vaccine**, [S. l.], v.
192 29, n. 3, p. 593–598, 2011. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.040.

193 WANG, N.; YANG, Z.; ZANG, M.; LIU, Y.; LU, C. Identification of Omp38 by
194 immunoproteomic analysis and evaluation as a potential vaccine antigen against *Aeromonas*
195 *hydrophila* in Chinese breams. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 74–81,
196 2013. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.10.003.

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

Capítulo 1

208

209

210

211

Artigo científico 1

212

213

214

215

Francisella noatunensis subsp. *orientalis*: **CULTURABILIDADE E RESPOSTA *in***

216

***vitro* DE LEUCÓCITOS ISOLADOS DE TILÁPIA-DO-NILO**

217

218

219

220

221

Artigo será enviado para o periódico científico:

222

Fish and Shellfish Immunology

223

224

225

226

Classificação A1

227

228

229

230

Francisella noatunensis subsp. *orientalis*: **CULTURABILIDADE E RESPOSTA *in***

231

***vitro* DE LEUCÓCITOS ISOLADOS DE TILÁPIA-DO-NILO**

232

233 Crystal Lodi CONDE *¹; Tulio Teruo YOSHINAGA²; Luara Lucena CASSIANO³; Jessyca

234 Ellen ALEXANDRE¹; Guilherme Nunes FERREZ¹; Erna Elisabeth BACH¹; José Roberto

235 KFOURY JÚNIOR²; Danielle de Carla DIAS¹; Carlos Massatoshi ISHIKAWA¹; Ricardo

236 HARAKAVA³; Maria José Tavares RANZANI-PAIVA¹; Leonardo TACHIBANA¹

237

238 ¹Instituto de Pesca de São Paulo - APTA/SAA - Brasil/ email: Ltachibana@sp.gov.br

239 ²Universidade de São Paulo - Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade

240 de Medicina Veterinária e Zootecnia

241 ³Instituto Biológico de São Paulo - APTA/SAA - Brasil

242

243 RESUMO

244

245 A produção global de peixes provenientes da aquicultura vem crescendo, e

246 consequentemente a intensificação da produção resulta um aumento da presença doenças na

247 aquicultura. No presente estudo foi utilizado a bactéria *Francisella noatunensis* subp.

248 *orientalis*. Foram propostos três ensaios. No ensaio I, o delineamento experimental para a

249 otimização do meio de cultivo da FNO foi em esquema fatorial de 2x2x4 com 4 repetições

250 por tratamento. Sangue fresco foi coletado de tilápia-do-nilo e posteriormente processado. A

251 FNO foi cultivada conforme descrito por Fernandez-Alarcon et al. (2019) e adaptado para

252 meio líquido. Os tratamentos receberam dois suplementos nutritivos (soro sanguíneo de

253 tilápia-do-nilo- ST e soro fetal bovino - SFB); duas concentrações deste suplemento (3 e 10%)

254 e quatro tempos de cultivo da bactéria (12, 24, 48 e 72h). O delineamento experimental do

255 ensaio II foi em esquema fatorial 3x2x3 com 6 repetições por tratamento. O meio de cultivo
256 MH suplementado com 1% de glicose e 0,1% de hidrócloro de L-cisteína monoidratado (3%
257 de ST ou SFB) foi utilizado como padrão nas amostras para avaliação do crescimento da FNO
258 nas diferentes concentrações de glicerol (20, 30 e 50%) e temperaturas (-20°C, -80°C e -196°C).
259 Os testes de criopreservação apresentados, o melhor desempenho na contagem absoluta foi
260 no -80°C com ST com 30% de glicerol. No ensaio III foi inativado a FNO com formaldeído e
261 testado o efeito dela inativada sobre leucócitos de diferentes órgãos. Os resultados sugerem
262 que o cultivo da FNO pode ser melhorado e que os efeitos sobre a proliferação podem ser
263 indicativos para a formulação de métodos de prevenção como vacinas. Os resultados
264 demonstraram quando o soro fetal bovino foi usado na concentração de 10% no meio de
265 cultura para isolamento, foi possível observar maior velocidade de crescimento da bactéria.
266 Soro sanguíneo de tilápia-do-nylo pode ser utilizado em substituição ao soro fetal bovino no
267 cultivo da FNO. O uso do soro de tilápia-do-nylo a 3% e 30% de glicerol a -80°C, demonstrou
268 ser a melhor metodologia para preservação.

269 Palavras-chave: Franciselose, microbiologia, meios de cultivo, criopreservação, cultivo
270 celular.

271

272 **ABSTRACT**

273

274 The global production of fish from aquaculture has been growing and the
275 production intensification results in a disease increasing in aquaculture. In the present
276 study, *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* was used at the experimental design of assay I
277 for the FNO culture medium optimization was in a 2x2x4 factorial scheme with 4
278 replications per treatment. The treatments were two nutritional supplements (Nile tilapia
279 blood serum - ST and fetal bovine serum - FBS); two concentrations of this supplement (3
280 and 10%) and four times of bacteria culture (12, 24, 48 and 72h). In the assay II, the
281 experimental design was in a 3x2x3 factorial scheme with 6 replications per treatment. In
282 the assay III, FNO was inactivated with formaldehyde and testing its inactivated effect on
283 leukocytes from different organs. The results suggest that the cultivation of FNO can be
284 improved and that the effects on proliferation can be indicative for the formulation of
285 prevention methods. In this study we demonstrate that tilapia blood serum can be used to
286 replace fetal bovine serum in the cultivation of FNO. Increasing the concentration of fetal
287 bovine serum to 10% in the isolation culture medium may aid in faster growth and increase

288 in bacterial mass for studies that need this purpose. The use of 3% tilapia serum with 30%
289 glycerol at -80°C proved to be the best methodology for cryopreservation. And the
290 proliferation results are promising for the development of inactive vaccines against FNO.
291 Keyboards: *Francisella noatunensis* subs *orientalis*, microbiology, culture media,
292 cryopreservation, cell culture

293 1. INTRODUÇÃO

294

295 A produção global de peixes em 2018 foi de aproximadamente 179 milhões de
296 toneladas com valor comercial estimado em USD 401 bilhões, dos quais USD 250 bilhões são
297 provenientes da aquicultura (FAO, 2020). No ano de 2021, o Brasil registrou uma produção
298 aquícola total de 841.005 toneladas, um aumento de 4,7% em relação ao ano anterior (PEIXE
299 BR, 2022). Dessa forma, é natural que a intensificação da produção resulte na expansão de
300 novos agentes infecciosos e doenças na aquicultura (RODRIGUES et al., 2018).

301 Entre as doenças infecciosas presentes na aquicultura, cerca de 55% são causadas por
302 bactérias, que em meio aquático possuem um ambiente propício para o seu
303 desenvolvimento. (MARTÍNEZ et al., 2021). A *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (FNO) é
304 uma bactéria intracelular facultativa que causa a franciselose, doença que afeta
305 principalmente cultivos durante baixas temperaturas (COLQUHOUN; DUODU, 2011;
306 SOTO; ENDRIS; HAWKE, 2010).

307 A franciselose tem sido associada como uma das principais causas de mortalidade em
308 tilápia-do-nylo em países como Noruega, Estados Unidos, Chile, Costa Rica, Japão e
309 Taiwan(MAUUEL, 2007; SOTO, 2009). No Brasil, essa bacteriose foi diagnosticada pela
310 primeira vez em 2016, no estado de Minas Gerais (JATOBÁ; KLIPP; HOPPE, 2016).

311 Animais com infecção por FNO podem desenvolver granulomas nos órgãos viscerais,
312 especialmente em órgãos hematopoiéticos como rim cranial e baço, porém também podem
313 ser achadas no coração e fígado (SHAHIN et al., 2020). Os peixes que são acometidos pela
314 FNO apresentam altas taxa mortalidade na forma aguda, apresentando sinais clínicos
315 inespecíficos como anorexia, exoftalmia, ascite, coloração escura, anemia, brânquias
316 hemorrágicas, excesso de muco, comportamento letárgico e natação errática (RAMIREZ,
317 2015; SOTO, 2010,2013^a).

318 A FNO possui estratégias para sobreviver à resposta imunológica dos peixes, que
319 após a bactéria ser fagocitada por células dendríticas ou macrófagos possibilita a

320 sobrevivência da bactéria à ação do sistema de degradação do fagolisossomos (BAKKEMO,
321 2011; BIRKBECK; FEIST; VERNER, 2011; CLEMENS, 2004; SANTIC, 2005).

322 Na falha da resposta imunológica primária, para eliminar o patógeno, as células
323 infectadas são envoltas por uma cápsula fibrosa espessa que mantém o patógeno isolado,
324 chamado de granuloma, sendo possível a sua observação macroscopicamente (MARTÍNEZ,
325 2021; SOTO, 2013c). Persistindo a doença, ocorre a replicação das bactérias encapsuladas,
326 podendo ocorrer ruptura do granuloma com disseminação das bactérias, causando mais
327 danos ao tecido (MARTÍNEZ et al., 2021).

328 O uso de antibióticos é a opção mais utilizada em diversos cenários de infecções
329 bacterianas (BOTELHO et al., 2015). Entretanto, o uso de antibióticos, tem sido associado à
330 proliferação de bactérias resistentes e contaminação do meio ambiente (BOTELHO et al.,
331 2015), o que estimulou a procura de alternativas para prevenção e controle da doença. Logo,
332 o desenvolvimento de vacinas é considerado uma opção promissora na prevenção de
333 bacterioses em peixes, reduzindo consideravelmente as perdas econômicas (WANG et al.,
334 2013).

335 Devido sua característica intracelular, a franciselose é de difícil diagnóstico e
336 tratamento (SOTO et al., 2009), sendo a realização de necrópsias uma ferramenta comumente
337 utilizada para diagnóstico. Os achados são órgãos com aumento de volume, aspecto
338 hemorrágico, podendo apresentar nódulos no baço, rins, fígado e brânquias (RAMIREZ et
339 al., 2015).

340 No estudo realizado por SOTO (2009), realizou-se o isolamento primário da bactéria
341 utilizando dois tipos de ágar: meio *Cystine Heart Agar* com 0,1% de cistina, suplementado
342 com 3% de soro fetal bovino. No Brasil, o isolamento e cultivo da FNO é feito com meio Ágar
343 Muller-Hinton (MH) (Difco™), contendo soro fetal bovino (3%), glicose (1%) e cloreto de L-
344 cisteína (0,1%) (FERNANDEZ et al., 2019^a).

345 Após o cultivo da FNO, o armazenamento correto é necessário para preservação
346 destes microrganismos. A metodologia de criopreservação é utilizada visando reduzir o
347 metabolismo e aumentar a preservação bacteriana (CASTRO et al., 2011). Há inúmeros
348 agentes crioprotetores, porém, o glicerol é o mais utilizado (AGUIAR et al., 2012).

349 Com base nas considerações acima, o presente trabalho visou otimizar as condições
350 de cultivo e preservação da FNO, além de verificar os efeitos da bactéria inativada sobre a
351 proliferação de leucócitos *in vitro*.

352

353 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

354

355 **2.1 Cultivo da bactéria**

356

357 Os isolados de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (0012018 Prevet Laboratório,
358 Jaboticabal-SP, Brasil) utilizada, são provenientes do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento
359 de Aquicultura/Instituto de Pesca. As bactérias foram cultivadas em meio Ágar Muller-
360 Hinton (MH) (Difco™), contendo soro fetal bovino (3%), glicose (1%) e cloreto de L-cisteína
361 (0,1%) conforme descrito por Alarcon et al. (2019). Após 72 horas de incubação, à
362 temperatura de 25°C foram submetidas à técnica de PCR convencional para confirmação
363 molecular.

364 **2.2 PCR convencional**

365 As colônias de bactérias isoladas foram ressuspensas em microtubos de 0,2 mL
366 contendo NFW (*nuclease free water*). Para o processo de PCR convencional direto das colônias,
367 utilizou-se primers específicos para a identificação de FNO (F:
368 GCGGATTAAGGTGGCCTTTGC e R: CCTGCAAGCTATTAACACAG), descritos por
369 Hsieh et al. (2006). A reação foi executada com a mistura de 20µL de reagentes do kit *GoTaq®*
370 *Colorless Master Mix* (Promega), 10 nM de primers e 200 ng/ µL de DNA genômico como
371 *template*, totalizando o volume de 25 µL por microtubo.

372 O DNA foi amplificado de acordo com a seguinte programação: desnaturação (3 min,
373 95°C), seguido por 36 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 60 seg e finalmente
374 um ciclo de 72°C por 10 min. Em seguida, todo o produto de PCR gerado foi aplicado em gel
375 de agarose a 2,4% corado com Safedye Nucleic Acid Stain submetidos a eletroforese por 20
376 min a 250V.

377

378 **2.3. Ensaio I - Otimização do cultivo da bactéria**

379

380 As tilápias-do-nilo foram obtidas na Núcleo Regional de Pesquisa de Pirassununga
381 (NRP/Centro de Pesquisa de Aquicultura/Instituto de Pesca/APTA/SAA), conforme
382 normas e recomendações da Resolução nº 592 de junho de 1992, do Conselho Federal de
383 Medicina Veterinária, e preceitos de Princípios Éticos da Experimentação Animal. Este

384 projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para experimentação animal do Instituto de Pesca
385 (Protocolo 01/2018).

386 O delineamento experimental para a otimização do meio de cultivo da FNO foi em
387 esquema fatorial de 2x2x4 com 4 repetições por tratamento. Os tratamentos foram dois
388 suplementos nutritivos (soro sanguíneo de tilápia-do-nylo - ST e soro fetal bovino - SFB);
389 duas concentrações deste suplemento (3 e 10%) e quatro tempos de cultivo da bactéria (12,
390 24, 48 e 72 h). Para isso, sangue fresco foi coletado da tilápia-do-nylo utilizando seringas não
391 heparinizadas. O sangue foi centrifugado 500 x g por 30 min, e o soro filtrado com filtro MF-
392 Millipore™ (25mm x 0,20µm) e armazenado a 4 °C até a sua utilização. Para o preparo do
393 meio que será utilizado, foram utilizados 64 tubos cônicos (Falcon) de 15 mL. Todos
394 tratamentos receberam meio de cultura suplementado com 1% de glicose e 0,1% de
395 hidrocloreto de L-cisteína monoidratado, conforme descrito por Fernandez-Alarcon et al.
396 (2019) e adaptado para meio líquido. As variáveis nos tratamentos foram as diferentes
397 concentrações e os diferentes soros, sendo 3 ou 10% de soro sanguíneo de tilápia-do-nylo, 3
398 ou 10% de soro fetal bovino. O cultivo a 3% SFB foi utilizado como controle.

399 A FNO foi semeada em tubo cônico de 15 mL contendo meio de cultivo líquido MH
400 suplementado (como descrito anteriormente, com 3% SFB), incubado em estufa B.O.D a 25°C
401 por 72h. Posteriormente, foi realizada a contagem bacteriana em Câmara de Neubauer
402 (AIYAR et al., 2017; CLEMENS; 2004), sendo a quantidade de células obtidas após cultivo de
403 5×10^6 células/µL.

404 Durante o experimento foi utilizada a concentração de 5×10^6 células correspondendo a
405 72 µL da solução mãe. Esta quantidade foi introduzida em tubos contendo 8 mL de meio,
406 incubados em estufa B.O.D a 25 °C e o crescimento avaliado após 12 h, 24 h, 48 h e 72 h.

407 A avaliação foi realizada pela quantificação bacteriana pela contagem em Câmara de
408 Neubauer com diluição de 1:10 e leitura da densidade óptica por espectrômetro (BEL
409 Photonics® Spectrophotometer SP 1105, 680nm). Para confirmação das amostras, foram
410 realizadas extrações de DNA (Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega®) seguidas pela
411 confirmação por PCR de acordo com a metodologia previamente citada.

412 **2.4. Ensaio II - Técnicas de preservação e armazenamento de cepas de *Francisella***
413 *noatunensis* subsp. *orientalis*.

414 O delineamento experimental foi em esquema fatorial 3x2x3 com 6 repetições por
415 tratamento. No total, 214 criotubos foram utilizados para realização deste ensaio. Sendo os
416 tratamentos: as temperaturas de armazenamento (-20°C, -80°C e -196°C). O meio de cultivo
417 MH suplementado com 1% de glicose e 0,1% de hidrócloro de L-cisteína monoidratado (3%
418 de ST ou SFB) foi utilizado como padrão nas amostras e os tratamentos consistiram nas
419 diferentes concentrações de glicerol no meio de cultivo (20, 30 e 50%).

420 A FNO foi semeada em tubo cônico de 15 mL contendo 8 mL de meio de cultivo
421 líquido MH suplementado (como descrito anteriormente, com 3% SFB), incubado em estufa
422 B.O.D a 25°C por 72h. Posteriormente, foi realizada a contagem bacteriana em Câmara de
423 Neubauer, sendo a quantidade de células obtidas após cultivo de $6,64 \times 10^6$ células/ μL
424 (AIYAR, 2017; CLEMENS; 2004).

425 A quantidade de bactérias inoculadas foi de $6,64 \times 10^6$ células correspondendo a 81,5
426 μL do tubo mãe + 918,5 μL de meio de cultivo padrão para FNO em cada criotubo (1 mL) e,
427 então foram incubadas por 72h em estufa B.O.D a 25°C. Em seguida, foi adicionado a
428 concentração necessária de glicerol para cada criotubo e posteriormente realizado o
429 armazenamento de forma direta nas temperaturas descritas. Após 24h, foram retirados 18
430 criotubos de cada método de armazenagem e, posteriormente, 1 semana depois outros 18.
431 Foi realizado o descongelamento das amostras em temperatura ambiente, em seguida estas
432 foram semeadas em meio líquido conforme descrito por Fernandez-Alarcon et al. (2019) e
433 incubadas em estufa B.O.D. a 25°C por 72h. Em seguida, foram realizadas as contagens do
434 número de células de FNO em Câmara de Neubauer e realizadas as extrações de DNA
435 (Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega®) seguidas pela confirmação por PCR.

436

437 **2.5. Ensaio III - Proliferação de leucócitos *in vitro***

438

439 O delineamento experimental utilizado neste ensaio foi inteiramente casualizado com
440 três tratamentos e três réplicas, onde foram utilizadas 10^6 , 10^5 , 10^4 células de FNO/ μL
441 inoculadas no cultivo celular de leucócitos.

442 As bactérias foram cultivadas até a concentração de 1×10^{10} células/ μL . Após o cultivo,
443 as bactérias foram centrifugadas $500 \times g$ por 20 min até a formação de um *pellet*. O *pellet* foi
444 ressuspendido em 0,3% de solução de formaldeído em PBS e mantido em *shaker* durante 72h

445 a 25°C. As bactérias inativadas foram lavadas três vezes em PBS estéril para remoção do
446 formaldeído. A inativação das bactérias foi determinada pela semeadura em meio MH
447 suplementado e incubados para confirmar o não crescimento de colônias.

448 O rim cranial, baço e fígado de tilápia-do-nylo foram coletados de forma asséptica, e
449 transferidos para placa de petri contendo meio RPMI 1640. Em seguida foram macerados e,
450 filtrados com Falcon® 40 µm Cell Strainer (*BD Falcon*). Posteriormente, a solução filtrada foi
451 transferida para um tubo falcon (15mL) e, adicionado o meio RPMI 1640 (suplementado com
452 10% de soro fetal bovino, 0,3% L-glutamina, 280mM de HEPES e 0,2% de NAHCO₃) e
453 centrifugando a 120 x g, durante 10 min; este procedimento foi repetido três vezes (SIWICK,
454 1980). Para separação dos leucócitos, 4 mL da solução filtrada foram ressuspensos e
455 colocados sobre 5 ml de Ficoll-Paque Plus (densidade 1077) (GE Healthcare) e centrifugados
456 a 500 x g por 30 min. O buffy coat foi recuperado, transferido para outro tubo e centrifugado
457 a 120 x g durante 10 min com meio RPMI 1640 suplementado como anteriormente (SIWICK,
458 1980).

459 Posteriormente os leucócitos do rim cranial, baço e fígado de tilápias-do-nylo foram
460 corados com *CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit* (Invitrogen, USA) e 100µL da suspensão
461 celular, com aproximadamente 1 milhão de células, foram colocadas em placas de 96 poços
462 de fundo redondo. Em cada poço foi adicionado 100µl de RPMI 1640 *medium* contendo as
463 bactérias. Diferentes concentrações de bactérias foram testadas (10⁶, 10⁵, 10⁴ células/µL) para
464 determinar se as bactérias inativadas estimulam a proliferação de leucócitos *in vitro*. Um
465 grupo controle utilizando o meio RPMI 1640 com concanavalina A (COn A) 20mg/µL foi
466 utilizado como controle de proliferação dos leucócitos. No grupo controle da fluorescência
467 (*stain*) foi adicionando apenas o reagente fluorescente no poço contendo o cultivo dos
468 leucócitos. Os leucócitos foram incubados a 20°C durante sete dias e análises de citometria de
469 fluxo foram realizadas após este período. Dados de citometria foram coletados no FACS
470 *Calibur Flow Cytometer* com *Cytek DxP Multi-Color Upgrade system* (BD-Cytec, USA) usando
471 *FlowJo-CE 7.5v* (Cytek, USA) e analisados no *FlowJo 10.7* software (BD, USA). O índice de
472 proliferação foi calculado com base na intensidade da fluorescência de cada tratamento.

473 2.6 Análises estatísticas

474

475 As análises estatísticas foram realizadas no *Graphpad Prism* (Graphpad Software,
476 USA) usando o teste de análise de variância (One-way ANOVA), seguido do teste de Tukey
477 para múltiplas comparações. A significância foi estabelecida para $p < 0,05$.

478

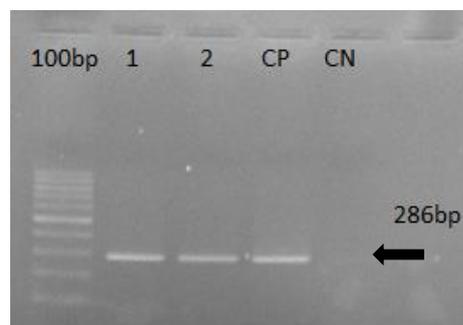
479 3.0 RESULTADOS

480

481 3.1 Identificação da cepa de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*

482

483 Após a realização da análise molecular de PCR convencional das duas amostras de
484 *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* utilizadas neste trabalho, referentes a cepa (0012018
485 Prevet Laboratório) observou-se à amplificação do fragmento de 286 pares de base nas
486 amostras analisadas. O controle positivo apresentou o mesmo tamanho de fragmento,
487 enquanto o controle negativo não foi observado amplificação do DNA. (Figura 1).



488

489

490 **Figura 1-** Eletroforese em gel de agarose (2,4%) dos produtos de DNA amplificados por PCR
491 a partir de colônias isoladas de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. (**100bp:** Marcador de
492 peso molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen®); **1, 2:** colônias isoladas de *Francisella*
493 *noatunensis* subsp. *orientalis*. **CP:** controle positivo **CN:** controle negativo).

494

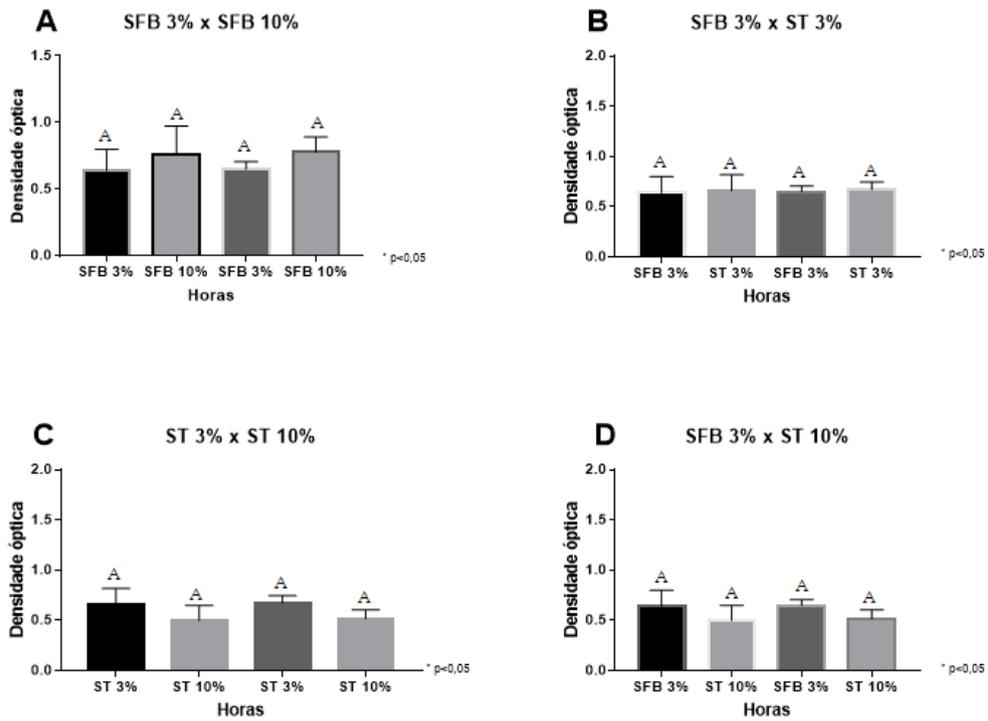
495 3.2 Ensaio I - Otimização do cultivo da bactéria

496

497 Após a avaliação da análise estatística após 72 horas de cultivo, verificou-se que não
498 houve melhor desempenho entre os diferentes tratamentos. As diferenças estatísticas não
499 foram significativas na densidade óptica nos diferentes tratamentos (Figura 2) ($p < 0,05$; One-
500 way ANOVA). Entretanto, a contagem em câmara de Neubauer mostrou que após 12h de
501 cultivo o tratamento com SFB na concentração de 10% apresentou uma quantidade maior de
502 células/ μl comparada com os outros tratamentos ($p = 0,0018$) (Figura 3A). Em 24h de cultivo
503 apenas o tratamento com SFB10% mostrou diferença significativa com o tratamento de ST
504 3% ($p = 0,0196$) (Figura 3B). Com 48h de cultivo o SFB na concentração de 3% observou-se
505 diferença significativa com o ST 3%, este que também apresentou diferença significativa com
506 o tratamento de ST 10% (Figura 3C) ($p = 0,6220$). Por último, após 72h de cultivo não houve
507 diferenças significativas entre os grupos (Figura 3D) ($p = 0,5745$).

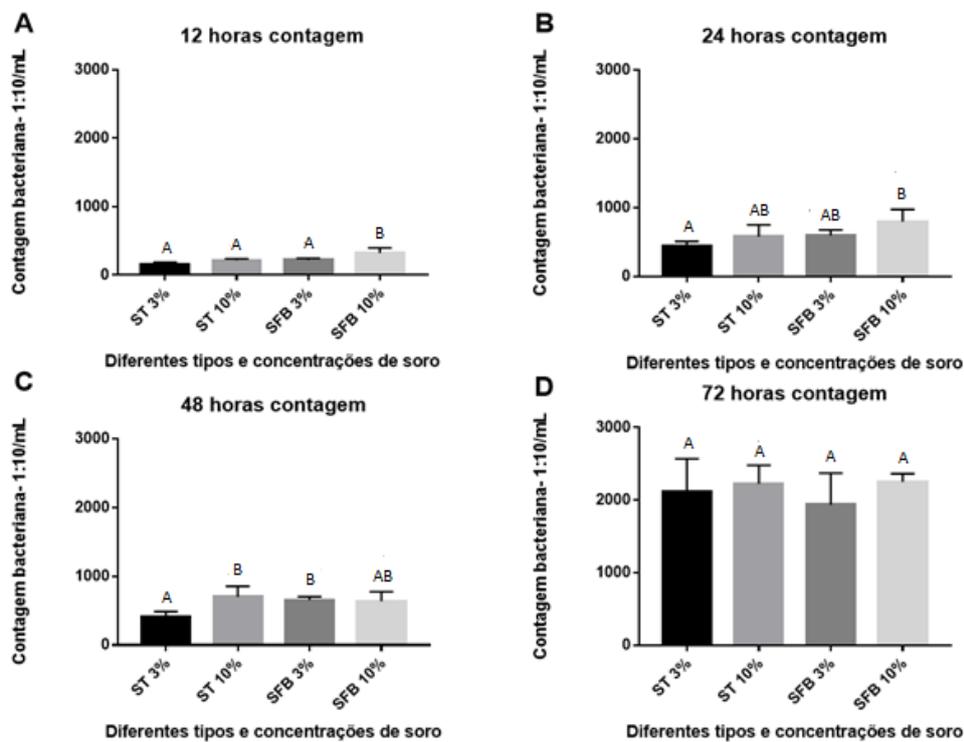
508

509



510
511

512 **Figura 2** - Avaliação da densidade óptica no desempenho do cultivo bacteriano em
513 diferentes horas, concentrações e tipos de soro. Médias seguidas estatisticamente pelo teste
514 Tukey (One-way ANOVA) realizados no *Graphpad Prism* (Graphpad Software, USA). ($\alpha =$
515 5%)

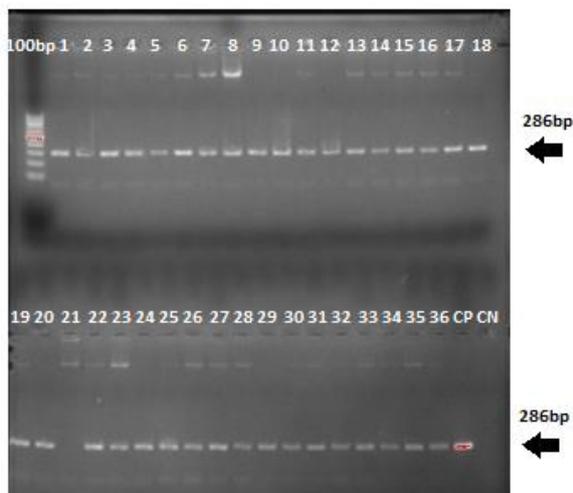


516

517 **Figura 3** – Contagem de células de *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* em câmara
 518 de Neubauer de diferentes tipos e concentrações de soro (nos tempos 12, 24, 48 e 72 horas).
 519 Médias seguidas estatisticamente pelo teste Tukey (One-way ANOVA, $p < 0,05$), realizados no
 520 *Graphpad Prism* (Graphpad Software, USA).

521 Após a análise de PCR a FNO foi confirmada pela observação da amplificação
 522 do fragmento de 286 pares de base nas amostras analisadas.

523



524

525 **Figura 4-** Resultado da eletroforese em gel de agarose (2,4%) dos produtos de DNA
 526 amplificados por PCR a partir de extração de DNA das amostras da otimização do cultivo da
 527 FNO. **100bp:** Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen®); **1-36:** colônias
 528 isoladas de FNO. **CP:** controle positivo **CN:** controle negativo).

529

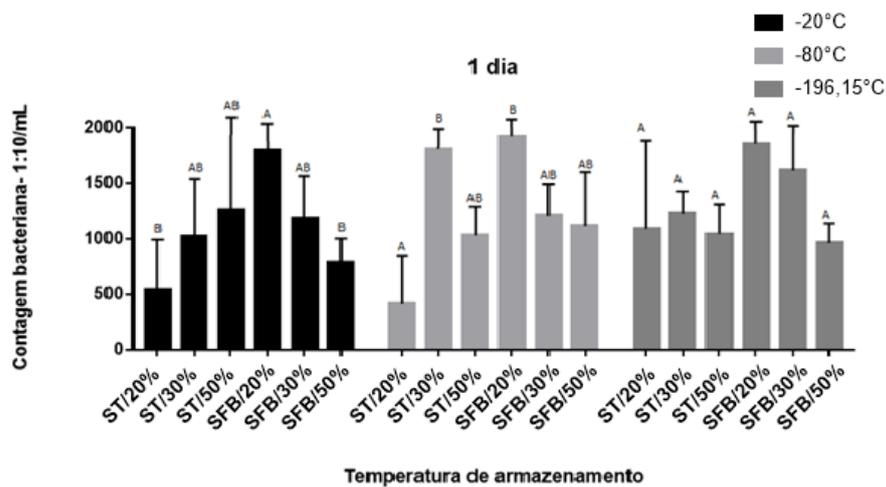
530 3.3 **Ensaio II - Técnicas de preservação e armazenamento de cepas de *Francisella***
 531 *noatunensis* subsp. *orientalis*.

532

533 Após análise em 24h (1 dia), não ocorreu diferença estatística significativa entre as
 534 temperaturas de armazenamento. Para criopreservação ocorreu um melhor desempenho
 535 utilizando 20% de glicerol em SFB ($P = 0,2972$) (Figura 5).

536 Entretanto após sete dias, ocorreu diferença estatística significativa entre as
 537 concentrações de glicerol, como o ST com 30% de glicerol e o SFB com 50% de glicerol e entre
 538 o ST com 30% com o ST com 50% de glicerol. Ao analisar a temperatura, o soro de tilápia-do-
 539 nilo com 30% de glicerol a -80°C apresentou diferença significativa entre o SFB com 50% de
 540 glicerol a -196°C ($P = 0,0098$) (Figura 6).

541



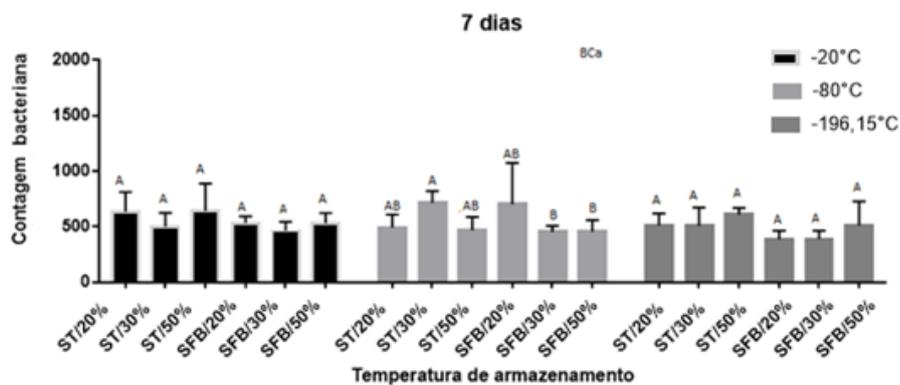
542

543

544 **Figura 5** – Concentrações de glicerol e método de criopreservação após 1 dia. Médias
545 seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (One-way ANOVA)
546 realizados no *Graphpad Prism* (Graphpad Software, USA). (**Concentrações:** **ST/20%**: meio
547 suplementado com ST com 20% de glicerol, **ST/30%**: meio suplementado com ST com 30%
548 de glicerol, **ST/50%**: meio suplementado com soro de tilápia-do-nilo com 50% de glicerol.
549 **SFB/20%**: meio suplementado com soro fetal bovino com 20% de glicerol, **SFB/30%**: meio
550 suplementado com soro fetal bovino com 30% de glicerol e **SFB 50%**: meio suplementado
551 com soro fetal bovino com 50% de glicerol).

552

553

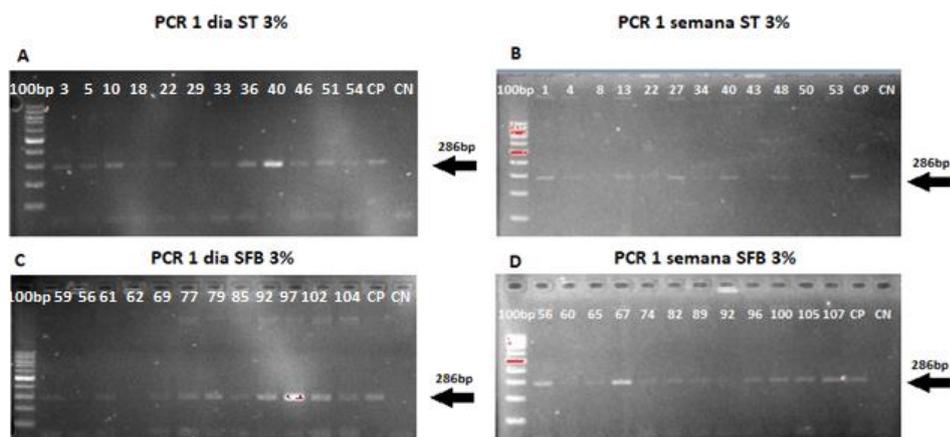


554

555

556 **Figura 6** - Temperaturas e concentrações de glicerol. Médias seguidas por mesma
 557 letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (One-way ANOVA) realizados no
 558 *Graphpad Prism* (Graphpad Software, USA). A significância foi estabelecida para $p < 0,05$.
 559 (**Concentrações:** **ST/20%**: meio suplementado com ST com 20% de glicerol, **ST/30%**: meio
 560 suplementado com ST com 30% de glicerol, **ST/50%**: meio suplementado com soro de tilápi-
 561 do-nilo com 50% de glicerol. **SFB/20%**: meio suplementado com soro fetal bovino com 20%
 562 de glicerol, **SFB/30%**: meio suplementado com soro fetal bovino com 30% de glicerol e **SFB**
 563 **50%**: meio suplementado com soro fetal bovino com 50% de glicerol).

564 Foi observada amplificação do fragmento de 286 pares de base nas amostras
 565 analisadas.



566

567 **Figura 7-** Resultado da eletroforese em gel de agarose (2,4%) dos produtos de DNA
 568 amplificados por PCR a partir de extração de DNA das amostras da criopreservação (100bp:
 569 Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen®); A: 3, 5, 10, 18, 22, 29, 33, 36,
 570 40, 46, 51, 54: colônias isoladas de FNO. B: 1, 4, 8, 13, 22, 27, 34, 40, 43, 48, 50, 53: colônias
 571 isoladas de FNO. C: 59, 56, 61, 69, 77, 79, 85, 92, 97, 102, 104: colônias isoladas de FNO. D: 56,
 572 60, 65, 67, 74, 82, 89, 92, 96, 100, 105, 107: colônias isoladas de FNO. CP: controle positivo CN:
 573 controle negativo.).

574

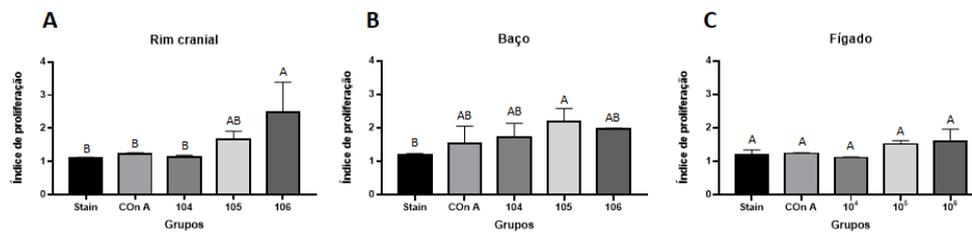
575 3.3.1 Ensaio III - Proliferação de leucócitos *in vitro*

576

577 A proliferação de leucócitos *in vitro* em diferentes concentrações de FNO inativadas
 578 em cultivo celular pode ser observada na Figura 8. Os valores de proliferação de leucócitos
 579 dos grupos Con A e 10^4 células/ μ L foram diferentes ($p= 0,0140$) em relação grupo 10^6
 580 células/ μ L apresentaram (Figura 8A). No cultivo celular do baço ocorreu diferença
 581 significativa entre a concentração de bactérias na diluição 10^5 células/ μ L em relação ao
 582 grupo controle não estimulado ($p=0,0458$) (Figura 8B). Entretanto, não foi encontrado
 583 diferença significativa entre as concentrações bacterianas na cultura celular do fígado ($p=$
 584 $0,0351$) (Figura 8C).

585

586



588

589

590 **Figura 8** - Proliferação de leucócitos em cultivo celular por citometria de fluxo
 591 considerando diferentes concentrações de bactérias. Médias seguidas por mesma letra não
 592 diferem estatisticamente pelo teste de análise de variância (One-way ANOVA) realizados no
 593 *Graphpad Prism* (Graphpad Software, USA) seguido do teste de Tukey para múltiplas
 594 comparações. A significância foi estabelecida para $p < 0,05$. **Stain:** Grupo controle, **COn A:**
 595 concavalina A, **concentrações:** 10⁴, 10⁵ e 10⁶.

595

596 4. DISCUSSÃO

597

598

599

600

601

A FNO está entre os principais agentes que acometem as tilápias-do-nilo nos períodos em que há baixas temperaturas da água (LEAL et al., 2014). É necessário o desenvolvimento de métodos de prevenção, sendo preciso melhorar as condições de cultivo bacteriano e a preservação desses microrganismos em laboratório. (BAKKEMO et al., 2011).

602

603

604

605

606

O cultivo da bactéria em laboratório é essencial para desenvolvimento de pesquisas sobre controle e tratamento, resposta imunológica dos peixes, desenvolvimento e produção de vacina. O que conseqüentemente gerou a necessidade de padronização e otimização do cultivo. Neste estudo, foi demonstrado que o aumento na concentração de SFB e ST no meio de cultura aumenta a quantidade de FNO *in vitro*.

607

608

609

Os meios de cultivo tradicionais para FNO comumente utilizaram o SFB (FERNANDEZ, 2019a; SOTO, 2009). Segundo RAMIREZ (2015), o reagente para o crescimento de bactérias é de alto custo. Neste estudo, foi então utilizado ST, e não houve

610 diferença observada no crescimento da FNO comparado com SFB. Isto sugeriu que o ST
611 pode ser utilizado em substituição SFB, devido a disponibilidade e fácil processamento,
612 reduzindo o custo. Entretanto, ao coletar o sangue, fatores como estresse, estado nutricional e
613 imunológico podem influenciar na qualidade do sangue coletado e, conseqüentemente, na
614 qualidade do soro (ARAUJO, 2011; CASTRO, 2020; DIAS, 2016; SOTO, 2011). O soro
615 sanguíneo de diferentes espécies de animais foi utilizado em vários estudos substituindo o
616 soro fetal bovino (MAUEL, 2007; NGUYEN, 2015; PULPIPAT, 2020; SOTO, 2009). Assim,
617 como a FNO é basicamente encontrada em órgãos hematopoiéticos (MAUEL et al., 2007), o
618 soro sanguíneo pode conter fatores nutricionais ou de crescimento específicos para ela. Além
619 disso, outros estudos mostram que a suplementação com hemoglobina já foi utilizada em
620 cultivos bacterianos com a FNO (LEAL; TAVARES; FIGUEIREDO, 2014; SOTO, 2013a, 2011).

621 Nos testes de criopreservação apresentados, o melhor desempenho na contagem de
622 células de FNO foi no armazenamento em -80°C com ST e 30% de glicerol após sete dias de
623 congelamento, diferindo do trabalhos apresentados por COLQUHOUN (2011); SOTO et al.
624 (2009). A metodologia de criopreservação com -80°C já é bastante comum em laboratórios,
625 sendo uma alternativa com menor custo que o nitrogênio líquido (LEAL; TAVARES;
626 FIGUEIREDO, 2014). Entretanto, na ausência de um ultrafreezer (-80°C) ou de nitrogênio
627 líquido (-196°C), em curto prazo as bactérias podem ser acondicionadas em temperatura de -
628 20°C, como demonstrado neste trabalho.

629 O cultivo da FNO pode ser melhorado e a proliferação de leucócitos pode ser
630 utilizado como indicativos da resposta imune e fornecer subsídios para o desenvolvimento
631 das vacinas para peixes (BAKKEMO, 2011; PULPIPAT, 2020; SHAHIN, 2019). Todavía é
632 recomendado testes in vivo (CARVALHO, 2018; PULPIPAT, 2020; SHAHIN, 2019) para
633 verificar a capacidade da resposta imunológica ao longo do período de proteção das tilápias
634 do-nilo durante o cultivo que pode variar de 6 a 8 meses.

635

636 **5. CONCLUSÃO**

637 Em conclusão, o ST pode ser utilizado em substituição ao SFB no cultivo da FNO. O
638 aumento da concentração de soro fetal bovino para 10% no meio de cultura de isolamento
639 aumenta a velocidade de crescimento da FNO. O uso do soro de tilápia-do-nylo a 3% com
640 30% de glicerol a -80°C, é a melhor metodologia para criopreservação da FNO. Houve
641 proliferação de leucócitos com a estimulação da FNO inativada.

642

643 **6. REFERÊNCIAS**

644 AIYAR, P.; SCHAEME, D.; GARCÍA-ALTARES, M.; FLORES, C D.; DATHE, H.;
645 HERTWECK, C.; SASSO, S; MITTAG, Maria. Antagonistic bacteria disrupt calcium
646 homeostasis and immobilize algal cells. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1-12,
647 2017. DOI: 10.1038/s41467-017-01547-8.

648 BOTELHO, A H.; MOURAD, M N N; FERREIRA, E M S A.; HERNANDES,LM.;
649 MELO, C VC. *FRANCISELLA* sp. - UMA REVISÃO. **Revista Científica De Medicina**
650 **Veterinária**, [S. l.], v. 25, p. 1679-7353, 2015.

651 ARAUJO, D d M.; PEZZATO, Antonio Celso; BARROS, Margarida Maria; PEZZATO,
652 Luiz Edivaldo; NAKAGOME, Fernando Kojima. Hematologia de tilápias-do-nylo
653 alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. **Pesquisa Agropecuaria**
654 **Brasileira**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 294-302, 2011. DOI: 10.1590/S0100-204X2011000300010.

655 AGUIAR A F, T D. \.; FÁTIMA, M; TEIXEIRA, S; TELES H, C.; MARTINS, G R.;
656 QUIRINO, R.; JÚNIOR, B.; COSTA C, E. Princípios básicos da criomicrobiologia: Enfoque nos
657 tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores [Basic principles of
658 criomicrobiologia: focus in kind of microorganisms and principals cryoprotectants
659 agents]**Acta Veterinaria Brasilica**, v. [s.l: s.n.].

660 BAKKEMO, K R.; MIKKELSEN, H.; BORDEVIK, M.; TORGERSEN, J.; WINTHER-
661 LARSEN, H C.; VANBERG, Christin; OLSEN, R.; JOHANSEN, L H.; SEPPOLA, M.
662 Intracellular localisation and innate immune responses following *Francisella noatunensis*
663 infection of Atlantic cod (*Gadus morhua*) macrophages. **Fish and Shellfish Immunology**, [S.
664 l.], v. 31, n. 6, p. 993-1004, 2011. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.08.020.

665 BIRKBECK, T. H.; FEIST, S. W.; VERNER-JEFFREYS, D. W. *Francisella* infections in
666 fish and shellfish. **Journal of Fish Diseases**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 173–187, 2011. DOI:
667 10.1111/j.1365-2761.2010.01226.x.

668 CARVALHO, P L. P. F.; YAMAMOTO, F Y.; BARROS, M M.; GATLIN, D M. L-
669 glutamine in vitro supplementation enhances Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus,
670 1758) leukocyte function. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 80, n. June, p. 592–599,
671 2018. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.06.043.

672 CASTRO, K S D.; FUGIMURA, M. S.; VAZ, L J.; MARCUSSO, P F. Estabilidade das
673 variáveis hematológicas em sangue de *Colossoma macropomum* armazenado com diferentes
674 anticoagulantes. [S. l.], p. 171–180, 2020.

675 CASTRO, S V.; CARVALHO, A d. A.; DA SILVA, C M. G.; FAUSTINO, L R; DA
676 FIGUEIREDO, J R.; RODRIGUES, A P R. Agentes crioprotetores intracelulares: características
677 e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.
678 l.], v. 39, n. 2, p. 1–18, 2011.

679 CLEMENS, D L.; LEE, Bai Yu; HORWITZ, Marcus A. Virulent and avirulent strains of
680 *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape
681 into the cytoplasm in human macrophages. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 72, n. 6, p.
682 3204–3217, 2004. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3204-3217.2004.

683 COLQUHOUN, D J.; DUODU, S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic
684 organisms. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 1–15, 2011. DOI: 10.1186/1297-9716-42-
685 47.

686 DIAS, M K R. Uso de imunoestimulantes no desempenho , fisiologia e imunidade de
687 alevinos de *Arapaima gigas* (Arapaimidae) Uso de imunoestimulantes no desempenho ,
688 fisiologia e imunidade de alevinos de *Arapaima gigas* (Arapaimidae). [S. l.], v. 1822, p. 1–61,
689 2016.

690 FAO. **The State of Food and Agriculture 2020**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.4060/cb1447en.

691 FERNANDEZ-A, M. F. et al. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged infection
692 by *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* via an intragastric route protocol. **Aquaculture**, [S.
693 l.], v. 510, n. November 2018, p. 380–385, 2019. a. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.06.007.

694 FERNANDEZ-A, M. F. et al. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged infection
695 by *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* via an intragastric route protocol. **Aquaculture**, [S.
696 l.], v. 510, n. June, p. 380–385, 2019. b. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.06.007.

697 HSIEH, C. Y.; TUNG, M. C.; TU, C.; CHANG, C. D.; TSAI, S. S. Enzootics of visceral
698 granulomas associated with Francisella-like organism infection in tilapia (*Oreochromis spp.*).
699 **Aquaculture**, [S. l.], v. 254, n. 1–4, p. 129–138, 2006. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.03.044.

700 JATOBÁ, A.; KLIPP, S P.; HOPPE, R. Primeiro relato de *Francisella noatunensis* subsp.
701 *orientalis* no sul do Brasil – RELATO DE CASO. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S. l.], v. 10, n. 2,
702 p. 172, 2016. DOI: 10.21708/avb.2016.10.2.5512.

703 LEAL, C. A. G.; TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Outbreaks and genetic
704 diversity of *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia
705 (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 5704–
706 5712, 2014. DOI: 10.4238/2014.July.25.26.

707 MARTÍNEZ-L, P.; MARTÍNEZ-P, M.; GOLLAS-GALVÁN, Teresa; HERNÁNDEZ-
708 LÓPEZ, Jorge; ROBLES-PORCHAS, Glen R. Granulomatosis in fish aquaculture: a mini
709 review. **Reviews in Aquaculture**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 259–268, 2021. DOI: 10.1111/raq.12472.

710 MAUEL, M. J.; SOTO, E.; MORALIS, J. A.; HAWKE, J. A. *Piscirickettsiosis*-like
711 syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic
712 agent. **Journal of Aquatic Animal Health**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 27–34, 2007. DOI:
713 10.1577/H06-025.1.

714 NGUYEN, V V.; DONG, H T.; SENAPIN, S.; PIRARAT, N. *Francisella noatunensis*
715 subsp. *orientalis*, an emerging bacterial pathogen affecting cultured red tilapia (*Oreochromis*
716 *sp.*) in Thailand *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, an emerging bacterial pathogen
717 affecting cultured red tilapia (*Oreochr.* [S. l.], n. February 2018, 2015. DOI:
718 10.1111/are.12802.

719 PEIXE BR. Peixe BR da Piscicultura. **Anuario 2022**, [S. l.], p. 1-140, 2022.

720 PULPIPAT, T.; MAEKAWA, S.; WANG, P C.; CHEN, S C. Immune responses and
721 protective efficacy of a formalin-killed *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* vaccine
722 evaluated through intraperitoneal and immersion challenge methods in oreochromis

723 niloticus. **Vaccines**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 1-14, 2020. DOI: 10.3390/vaccines8020163.

724 RAMIREZ P.; J G. The fish pathogen *Francisella orientalis*: characterisation and vaccine
725 development. [S. l.], n. April, p. 1-263, 2015. Disponível em:
726 http://dspace.stir.ac.uk/handle/1893/21822?mode=full#.Wi6_5bacaxM.

727 RODRIGUES, M.; FRANCISCO, C J.; DAVID, G S.; DA SILVA, R J.; FALCONE-DIAS,
728 M F.; JÚNIOR, João Pessoa Araújo. Monitoring of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in
729 farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Aquaculture International**, [S. l.], v. 26,
730 n. 1, p. 127-138, 2018. DOI: 10.1007/s10499-017-0204-4. Disponível em:
731 <http://link.springer.com/10.1007/s10499-017-0204-4>.

732 SANTIC, M.; MOLMERET, M.; KLOSE, K E.; JONES, S.; ABU KWAIK, Y. The
733 *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IgIC and its regulator MgIA are essential
734 for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm.
735 **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 7, p. 969-979, 2005. DOI: 10.1111/j.1462-
736 5822.2005.00526.x.

737 SHAHIN, K.; PIREZAN, F.; ROGGE, M.; LAFRENTZ, B R.; SHRESTHA, R P.;
738 HILDEBRAND, M.; LU, F.; HOGENESCH, H.; SOTO, E. Development of IgIC and GroEL
739 recombinant vaccines for francisellosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and**
740 **Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 105, n. April, p. 341-349, 2020. DOI:
741 10.1016/j.fsi.2020.07.045.

742 SHAHIN, K.; SHINN, A P.; METSELAAR, M.; RAMIREZ, P.; Jose Gustavo;
743 MONAGHAN, Sean J.; THOMPSON, Kim D.; HOARE, Rowena; ADAMS, Alexandra.
744 Efficacy of an inactivated whole-cell injection vaccine for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*
745 (L), against multiple isolates of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from diverse
746 geographical regions. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 89, n. April, p. 217-227,
747 2019. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.03.071.

748 SOTO, E.; HAWKE, J. P.; FERNANDEZ, D.; A MORALES, J. *Francisella* sp., an
749 emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. **Journal of Fish**
750 **Diseases**, [S. l.], v. 32, n. 8, p. 713-722, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2009.01070.x.

751 SOTO, E.; KIDD, S.; GAUNT, P. S.; ENDRIS, R. Efficacy of florfenicol for control of
752 mortality associated with *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in Nile tilapia, *Oreochromis*

753 *niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 411–418, 2013. a. DOI:
754 10.1111/j.1365-2761.2012.01425.x.

755 SOTO, E.; ENDRIS, R G.; HAWKE, J P. In vitro and in vivo efficacy of florfenicol for
756 treatment of *Francisella asiatica* infection in tilapia. **Antimicrobial Agents and**
757 **Chemotherapy**, [S. l.], v. 54, n. 11, p. 4664–4670, 2010. DOI: 10.1128/AAC.00206-10.

758 SOTO, E.; KIDD, S.; MENDEZ, S.; MARANCIK, D.; REVAN, F.; HILTCHIE, D.;
759 CAMUS; A. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* pathogenesis analyzed by experimental
760 immersion challenge in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Veterinary Microbiology**, [S.
761 l.], v. 164, n. 1–2, p. 77–84, 2013. b. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.01.024.

762 SOTO, E.; KIDD, S.; MENDEZ, S.; MARANCIK, D.; REVAN, F.; HILTCHIE, D.;
763 CAMUS, A. *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* pathogenesis analyzed by experimental
764 immersion challenge in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Veterinary Microbiology**, [S.
765 l.], v. 164, n. 1–2, p. 77–84, 2013. c. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.01.024. Disponível em:
766 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.024>.

767 SOTO, E.; WILES, J.; ELZER, P.; MACALUSO, K.; HAWKE, JP. Attenuated *Francisella*
768 *asiatica* igIC mutant induces protective immunity to francisellosis in tilapia. **Vaccine**, [S. l.], v.
769 29, n. 3, p. 593–598, 2011. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.040.

770 WANG, N.; YANG, Z.; ZANG, M.; LIU, Y.; LU, C. Identification of Omp38 by
771 immunoproteomic analysis and evaluation as a potential vaccine antigen against *Aeromonas*
772 *hydrophila* in Chinese breams. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 74–81,
773 2013. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.10.003.

774