

UniFECAF – FACULDADE CAPITAL FEDERAL
Curso de Biomedicina

THAYS FERNANDA FONTES BLANCO

**TEMPERATURA, SALINIDADE E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NA
CULTURABILIDADE DE *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis***

Orientador: Dr. Leonardo Tachibana

TABOÃO DA SERRA

2024

THAYS FERNANDA FONTES BLANCO

**TEMPERATURA, SALINIDADE E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS NA
CULTURABILIDADE DE *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial
para obtenção do título de
Biomédico, da Faculdade Capital
Federal.

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria da Agricultura e
Abastecimento e Instituto de pesca.
Programa de Iniciação científica –
Bolsista PIBIC

Orientador: Dr. Leonardo Tachibana

TABOÃO DA SERRA

2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me sustentado até aqui, me dando forças e ânimo para não desistir desse sonho.

Agradeço a minha família por me apoiar nessa longa jornada, sempre vibrando pelo meu sucesso.

Ao meu orientador Leonardo Tachibana, pela oportunidade e conhecimento adquirido e aos meus colegas de laboratório por todo apoio e aos desafios compartilhados.

Agradeço ao programa institucional de bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) e ao Instituto de pesca do governo de São Paulo pelo incentivo e oportunidade concedida.

RESUMO

A *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (FNO) é uma bactéria Gram-negativa com alta capacidade de desencadear uma infecção sistêmica na tilápia-do-nilo

(*Oreochromis niloticus*), podendo gerar grande impacto negativo na indústria aquícola.

Portanto, este projeto tem como objetivo verificar a culturabilidade em meios líquidos distintos, os efeitos da temperatura e salinidade, e a resistência aos antibióticos da bactéria patogênica FNO, a fim de desenvolver um protocolo de cultivo in vitro. Para esta finalidade, foram testados dois meios líquidos para a cultura: a) Brain Heart Infusion suplementado com levedura, cisteína e maltose (BHI suplementado) e b) meio sintético. Os testes de temperatura para o crescimento de FNO foram realizados em microplacas estéreis em seis

replicatas, incubados durante 72 horas em cinco temperaturas diferentes (17, 19, 23, 26 e 28°C). Para avaliação dos efeitos de salinidade no crescimento, foram testadas as concentrações de NaCl de 0,0; 1,0; 3,0 e 5,0 g.L⁻¹, em microplacas estéreis, seguindo a mesma metodologia dos testes de temperatura. Para realização do antibiograma, foi preparada uma solução bacteriana inicial. A suspensão bacteriana foi distribuída de forma homogênea com swab na placa de Petri com o meio sólido BHI Agar suplementado. Em seguida, discos com antibióticos (amoxilina, ampicilina, ciprofloxacino, gentamicina, sulfazotrim e tetraciclina) foram adicionados para verificar as formações de halos de inibição. De acordo com a análise estatística, verificou-se que o meio e a temperatura de incubação alteraram de forma significativa no crescimento de FNO, além de detectar a interação destes dois fatores ($P < 0.05$). A medição de absorbância das suspensões bacterianas (FNO), após 72 horas de incubação, demonstrou que meio líquido Brain Heart Infusion - suplementado com Cisteína, Maltose e levedura possibilitou maior desenvolvimento da bactéria patogênica em temperaturas acima de 23°C. Em meio sintético a FNO apresentou o pico de crescimento na temperatura de 19°C e em meio BHI foi de 26°C. Os resultados das concentrações salinas testadas demonstraram que o patógeno se prolifera até a concentração de 3 g.L⁻¹ de NaCl. No teste de resistência a antibióticos, foi possível observar o halo de inibição de 1,50 cm de diâmetro com a gentamicina. A partir dos resultados obtidos, verifica-se que o tipo de meio aplicado, a temperatura e a salinidade interferem de forma significativa no cultivo da FNO. Para o cultivo in vitro desta cepa de bactéria patogênica, pode-se utilizar o meio líquido BHI suplementado com maltose e cisteína na temperatura de incubação de 26°C. Além disso, observa-se a alta capacidade de resistência por parte desta bactéria frente aos antibióticos.

Palavras-chave: Bactéria, patogenias, franciselose

ABSTRACT

Francisella noatunensis subsp. *orientalis* (FNO) is a Gram-negative bacterium with a high capacity to trigger a systemic infection in Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*), which can have a major negative impact on the aquaculture industry.

Therefore, this project aims to verify the culturability in different liquid media, the effects of temperature and salinity, and the resistance to antibiotics of the pathogenic bacterium FNO, in order to develop an in vitro culture protocol. For this purpose, two liquid media for culture were tested: a) Brain Heart Infusion supplemented with yeast, cysteine and maltose (BHI supplemented) and b) synthetic medium. Temperature tests for FNO growth were performed on sterile microplates in six replicates, incubated for 72 hours at five different temperatures (17, 19, 23, 26 and 28°C). To evaluate the effects of salinity on growth, 0.0 NaCl concentrations were tested; 1.0; 3.0e 5.0 g.L⁻¹, in sterile microplates, following the same methodology as the temperature tests.

To perform the antibiogram, an initial bacterial solution was prepared,. The bacterial suspension was distributed homogeneously with a swab in the Petri dish with the supplemented solid BHI Agar medium. Then, discs with antibiotics (amoxicillin, ampicillin, ciprofloxacin, gentamicin, sulfazotrin and tetracycline)

were checked for inhibition halo formations. According to the statistical analysis, it was found that the incubation medium and temperature significantly altered the growth of FNO, in addition to detecting the interaction of these two factors ($P < 0.05$). The absorbance intensity of the bacterial suspensions (FNO), after 72 hours of incubation, level that liquid medium Infusion Brain Heart - supplemented with Cysteine, Maltose and yeast allowed a greater development of the pathogenic bacteria at a temperature above 23 ° C. In a synthetic medium a FNO showed the peak of growth at a temperature of 19 ° C and in BHI medium it was 26 ° C. The results of the tested saline recommendations demonstrated that the pathogen proliferates up to a concentration of 3 g.L⁻¹ of NaCl. In the antibiotic resistance test, it was possible to observe the 1.50 cm diameter inhibition zone with gentamicin. From the results obtained, it appears that the type of medium used, temperature and salinity interfere in a cultivated way in the cultivation of FNO. For in vitro cultivation of this strain of pathogenic bacteria, BHI liquid medium supplemented with maltose and cysteine can be used at an incubation temperature of 26°C. Also, note the high resistance capacity of this bacterium against antibiotics.

Key words: francisellosis, bacterium, pathogenesis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FNO - FRANCISELLA NOATUNENSIS subsp Orientalis

• 1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de peixes é potencialmente promissora para economia global e vem se expandindo cada vez mais, e resultantemente a intensificação dessa produção, naturalmente, há o surgimento de novos agentes infecciosos na aquicultura (RODRIGUES et al., 2018).

A FNO está entre os principais agentes infecciosos que acometem as tilápias-do-nilo nos períodos em que há baixas temperaturas da água (LEAL et al., 2014). Com base nas considerações acima, o presente trabalho visou otimizar as condições de crescimento de FNO, os efeitos da salinidade e a resistência a antibióticos para controle da franciselose.

• 2. JUSTIFICATIVA

A *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (FNO), pode causar infecção sistêmica à medida que invade o peixe, danificando órgãos internos ou causando infecções externas, quando os sinais da doença é observado em tanques de cultivo, possivelmente levará ao surto de franciselose, uma vez que essa bactéria apresenta comportamento intracelular facultativo e é altamente virulenta, podendo infectar todos os peixes cultivados juntos no mesmo sistema de circulação de água.

Este trabalho objetiva-se conhecer o comportamento dessa bactéria patogenicidade afim de evitar surtos da franciselose, além de obter-se um estudo sistêmico para criação da vacina.

• 3. OBJETIVOS

Objetivou com este trabalho, avaliar o crescimento de FNO em diversas temperaturas, em meios de cultivo diferentes, os efeitos da salinidade e a sensibilidade e resistência desta bactéria patogênica à diversos antibióticos afim de desenvolver um protocolo de cultivo in vitro.

• 4. METODOLOGIA

A bactéria patogênica *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* foi adquirida pela

empresa PREVET Ltda., isolada diretamente de cultivos de tilápia-do-nilo em tanquesrede na região noroeste do estado de São Paulo, município de Santa Fé do Sul. Conservadas em meio de cultura BHI cisteína + glicerol (10%) e mantidas sob temperatura de -20°C, posteriormente, foram transportadas para o Instituto de Pesca – SP, CPA.

Ensaio

Temperatura de incubação para o crescimento de FNO

Para realização deste ensaio, foram utilizados dois meios líquidos para a cultura: a) Brain Heart Infusion suplementado com levedura, cisteína e maltose (BHI suplementado) e b) meio sintético (Tabela 1).

Após o preparo do inóculo inicial de concentração bacteriana com absorbância de

0,50 (600nm), foram transferidos 0,025ul da concentração para os poços de microplacas estéreis, contendo 0,250ul de cada meio de cultura, e incubados por 72 horas, nas temperaturas 17, 19, 23, 26 e 28C, sem agitação, seguindo a metodologia de RAMÍREZ-PAREDES et al. (2017), com modificações. A densidade ótica foi avaliada após o término da incubação, em 600nm.

Tabela 1. Meios de cultura testados

Meios de cultura	Composição (por litro)
Brain Heart Infusion BD Difco– Suplementado com levedura, cisteína e maltose.	37,0 g BHI, 5,0 g levedura, 4,0 g maltose, 1,0 g cisteína
Sintético – KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ , NH ₄ Cl, 0,5 g MgSO ₄ . 7H ₂ O, NaCl, levedura, cisteína e maltose.	0,5 g KH ₂ PO ₄ , 1,5 g K ₂ HPO ₄ , 1,0 g NH ₄ Cl, 0,5 g MgSO ₄ . 7H ₂ O, 5,0 g NaCl. 1,0 g levedura, 0,5 g cisteína e 3,0 g maltose.

Efeitos da salinidade para o crescimento de FNO

Para a realização deste teste, foram preparadas concentrações de NaCl, partindo de 0,0; 1,0; 3,0 e 5,0 g por litro, seguindo o método de REZGUI (Raja et al., 2012), com modificações. (600nm), 0,025ul da concentração foi transferido para os poços de microplacas estéreis contendo 0,225µL do meio BHI – Suplementado, adicionado as diferentes concentrações salinas e a temperatura otimizada para o crescimento de FNO, em 6 replicações, incubados por 72 horas. A densidade ótica foi avaliada após o término da incubação, a 600nm.

Resistência a antibióticos de FNO.

Para este estudo foi seguida rigorosamente o método de Kirby e Bauer, descrito

no manual do antibiograma pela técnica de difusão em disco (Laborclin, 2007). Foram testados 6 antibióticos diferentes, discos comercializados já preparados, afim de avaliar a resistência de FNO, sendo eles, amoxicilina 10µg, tetraciclina

30µg, ampicilina 10µg, gentamicina 10µg, sulfazotrin 25µg e ciprofloxacina 5µg. Após o preparo de uma suspensão bacteriana de cultivo recente, com absorbância de 0,6 (600nm), embebeu-se um swab estéril na suspensão, comprimindo-o contra as paredes para remover o excesso, aplicando na placa de BHI ágar - Suplementado suavemente, em 5 direções, abrangendo toda a superfície da placa. Após aproximadamente 15 minutos de secagem, com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada, foram colocados 3 discos preparados com antibióticos diferentes, em 3 repetições por placa e inoculados por 4 dias, na temperatura de 26°C. Para obtenção dos resultados, os halos foram medidos com o auxílio de uma régua

Análises estatísticas

Primeiramente, os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Jaque-Bera) e de homocedasticidade das variâncias (Shapiro-Wilk). Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA (análise de variância) e de regressão. Para estas análises, foi utilizado o programa de software PAST versão 3.19.

• 5. DESENVOLVIMENTO TEÓRICO

O cultivo de tilápia tem se mostrado de grande valor no mercado brasileiro. As previsões da Peixe BR (Associação Brasileira de Piscicultura), acredita que até o ano de 2030 a seu cultivo represente 80% da produção nacional, tornando o Brasil o terceiro maior produtor global de tilápia. (Zampieri, 2023)

Em 2021, o Brasil registrou uma produção aquícola total de 841.005 toneladas, um aumento de 4,7% em relação ao ano anterior (PEIXE BR, 2022). Contudo, é natural que a intensificação da produção, resulte no aparecimento de novas doenças aquícolas. (RODRIGUES et al., 2018).

A ocorrência de doenças em peixes é um processo complexo envolvendo a interação da bactéria patogênica, suscetibilidade do peixe hospedeiro e alguns fatores ambientais. A franciselose é causada pela bactéria patogênica *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (FNO), uma bactéria Gram negativa, de comportamento intracelular facultativo (COLQUHOUN, 2011; SOTO, 2010).

Esta bactéria patogênica é agora reconhecida como uma das mais importantes patógenos de tilápia (Soto and Revan, 2012), o autor descreve que apenas 23

unidades formadoras de colônia (UFC) de *Francisella* sp. são capazes de iniciar uma doença no peixe infectado, fazendo desta, uma das mais patogênicas bactérias para tilápia e causam grandes perdas econômicas na indústria aquícola. A FNO, causa infecção sistêmica à medida que invade o peixe, danificando órgãos internos ou causando infecções externas. O primeiro sinal desta infecção surge quando o peixe aparenta estar lento e recusando comida. À medida que a doença avança, o peixe pode ser observado na superfície da água ou perto da aeração, batimento opercular acelerado, podendo também apresentar lesões na pele e nadadeiras corroídas. Nos órgãos internos pode haver a esplenomegalia com nódulos brancos. O baço e o rim cefálico também podem estar maiores que o normal e com nódulos brancos (RAMIREZ et al., 2015) no entanto, estes sinais clínicos podem estar presentes em muitos outros tipos de surtos. Assim, a confirmação da identificação da doença pode ser feita através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Desde sua primeira identificação, poucos estudos têm como foco está bactéria sendo o tratamento contra sua proliferação normalmente realizado com antibióticos. Entretanto, o uso de antibióticos tem sido associado a proliferação de bactérias resistentes e contaminação no meio ambiente (BOTELHO et al., 2015).

A FNO é capaz de sobreviver a condições de baixa disponibilidade de nutrientes em microcosmos de água salgada e de água doce, no entanto, temperatura e salinidade parecem desempenhar um grande papel em sua culturabilidade e virulência (Soto and Revan 2012).

Embora a FNO seja a causa de muitos surtos que acarretam em perdas significativas na aquicultura, sua culturabilidade ainda não foi totalmente estudada. Além disso, devido sua característica intracelular, a franciselose é de difícil diagnóstico e tratamento. As colônias de *Francisella* são geralmente obtidas depois de 3 a 5 dias de incubação, o que poderia ser uma desvantagem para um tratamento específico no caso de um surto (SOTO et al., 2009). Com o avanço da doença, ocorre a replicação das bactérias encapsuladas, podendo ocorrer ruptura do granuloma e a dissipação das bactérias, ocasionando danos irreversíveis e severos ao tecido afetado (MARTÍNEZ et al., 2021).

O surto de franciselose tem sido associada com uma das principais causas de mortalidade em tilapias na Noruega, Estados Unidos, Chile, Costa Rica, Japão e Taiwan (MAUEL, 2007; SOTO 2009)

Nota-se diferenças entre a temperatura ótima para FNO. Uma cepa da Costa Rica tem uma temperatura ótima de crescimento a 28°C (Soto et al., 2009), a temperatura ótima de crescimento de duas cepas isoladas da Noruega (Mikalsen et al., 2007; Nylund et al., 2006) foram, respectivamente, 22, 15 e 19°C. (Kamaishi et al., 2010) descreveram que a temperatura ótima de crescimento de cepas de *Francisella* isoladas no Japão foi de 17-22°C.

As análises destes dados, mostraram que a temperatura ótima de crescimento de FNO provavelmente depende do local em que a bactéria foi isolada. As cepas de FNO são geralmente particulares em seu crescimento em laboratório.

• 6. RESULTADOS

TEMPERATURA

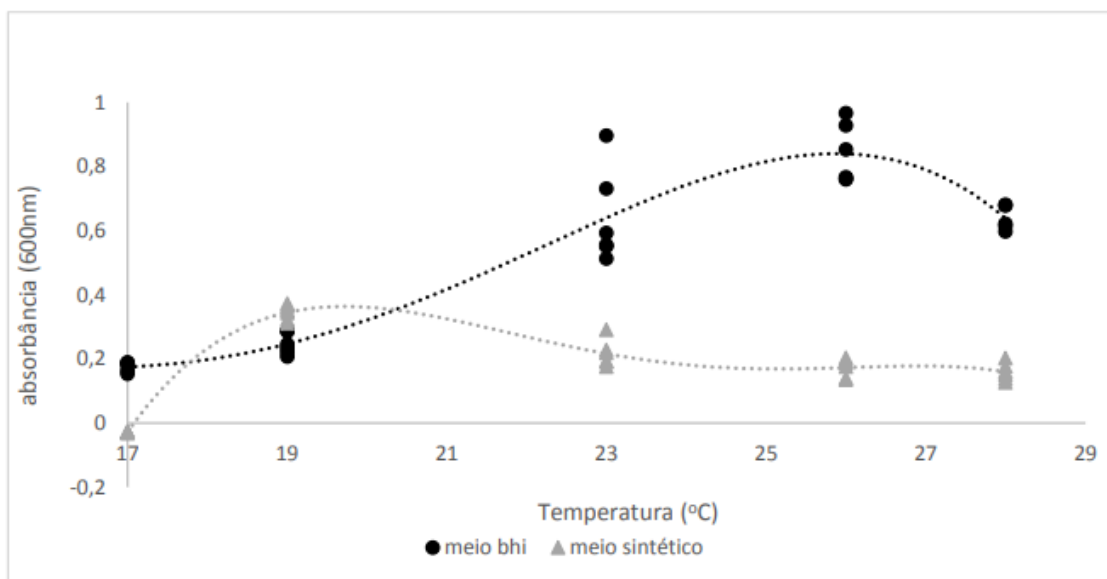


FIGURA 1. ABSORBÂNCIAS DE FRANCISELLA NOATUNENSIS SUBSP. ORIENTALIS (FNO) CULTIVADAS EM MEIOS LÍQUIDOS BHI SUPLEMENTADO E SINTÉTICO AVALIADO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

*EQUAÇÃO MEIO BHI: $-0,0001405X^4 + 0,01028X^3 - 0,2688X^2 + 2,997X - 11,87$ (R2 0,92) *EQUAÇÃO MEIO SINTÉTICO: $-0,0004025X^4 + 0,03854X^3 - 1,372X^2 + 21,51X - 124,8$ (R2 0,96)

De acordo com a análise estatística, verificou-se que o meio e a temperatura de

incubação alteraram de forma significativa no crescimento de FNO, além de detectar a interação destes dois fatores ($P < 0.05$). A medição de absorbância das suspensões bacterianas (FNO), após 72 horas de incubação, demonstrou que meio BHI suplementado possibilitou maior desenvolvimento da bactéria patogênica em temperaturas acima de 23 °C. O meio sintético apresentou o pico de crescimento na temperatura de 19°C ao passo que em meio BHI foi em 26°C.

As temperaturas acima dos 23°C possibilitam o maior crescimento de FNO, sendo a temperatura ótima de 26°C. Os dados apresentaram também, que temperaturas

superiores a 28°C, interferem negativamente ($P < 0,05$) em seu desenvolvimento.

Em relação aos meios de cultura testados, foi possível verificar um bom desenvolvimento bacteriano no meio BHI suplementado.

SALINIDADE

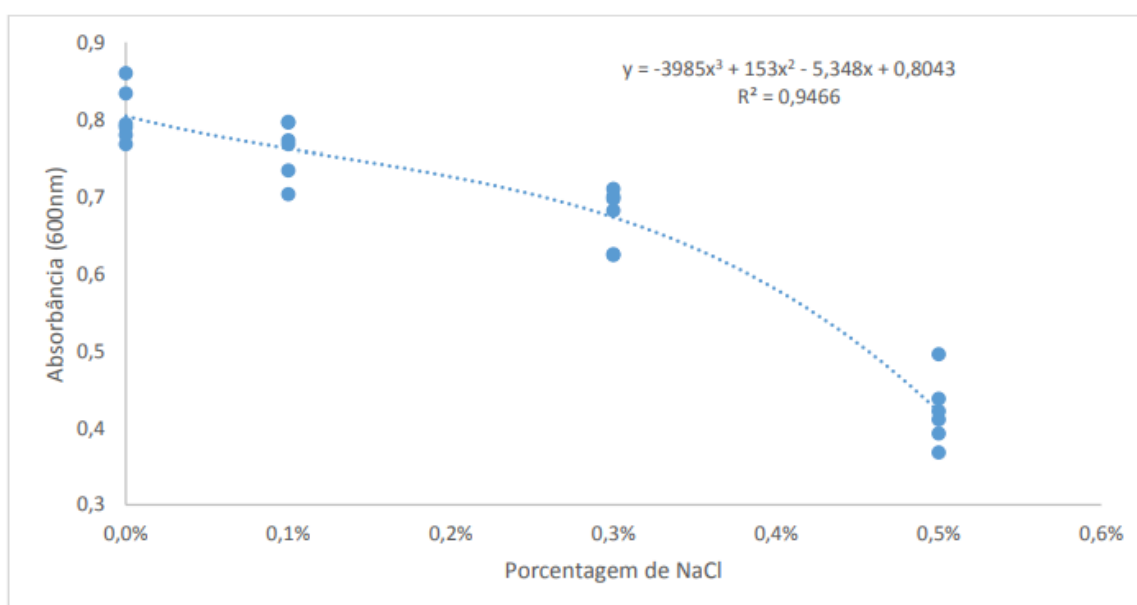


Figura 2. Gráfico de medição de absorbância de *Francisella noatunensis* subsp *orientalis* (FNO) cultivadas em meio líquido BHI suplementado com variações de concentrações de NaCl. Equação: $-3985x^3 + 153x^2 - 5,348x + 0,8043$ ($R^2 = 0,9466$).

De acordo com os dados obtidos através da análise estatísticas das culturas bacterianas com as concentrações salinas diferentes, é possível observar que em até 3 g.L⁻¹ de NaCl, não interferem significativamente no crescimento de FNO, concentrações acima desses valores, houve menor desenvolvimento bacteriano.

RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

As análises de resistência aos antibióticos demonstraram que as bactérias são

resistentes aos antibióticos testados, amoxicilina - 10µg, tetraciclina - 30µg, ampicilina - 10µg, gentamicina - 10µg, sulfazotrin - 25µg e ciprofloxacina - 5µg. Somente foi possível observar halo de inibição de 1,5 cm de diâmetro para a gentamicina.

• 7. DISCUSSÃO

A *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, é uma bactéria patógena para peixes, gerando doenças e grandes perdas na aquicultura em todo mundo (Ottem et al.,2009). Este estudo objetivou se avaliar diversas condições de cultivo bacteriano e sensibilidade a antibióticos, afim de otimizar os meios de cultura, temperatura e salinidade para melhor desenvolvimento bacteriano, tais como os testes de sensibilidade. A temperatura otimizada dessa cepa de FNO, foi a 26°C, demonstrando que o cultivo no meio de cultura BHI - suplementado apresenta maior desenvolvimento bacteriano, decorrente a quantidade de aminoácidos, ácidos graxos e minerais em relação ao meio sintético. Desta forma, o BHI suplementado permite que FNO prolifere em temperaturas acima de 19°C, suportando até 28°C. Em comparação com os resultados de RAMÍREZ-PAREDES et al. (2017), a temperatura ótima de crescimento bacteriano em meio BHI foi mais baixa (26°C) em relação ao meio Mueller-Hinton II com ajuste de cátions e suplementados com 2% de IsoVitaleX (BD, Oxford, Reino Unido) e 0.1% D-(+)-glucose ACS (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido), a qual foi entre 28°C e 28,5. Logo, Kamaishi et al., (2010) descreveram que a temperatura ótima de crescimento de cepas de *Francisella* isoladas no Japão foi de 17-22°C. Nota se que as diferentes cepas dessa bactéria patogênica, se adaptam em diversas temperaturas. Nos testes de salinidade, nota se como as diferentes concentrações de NaCl podem afetar o crescimento bacteriano, como apresenta o estudo de Nóbrega et al. (2004), onde demonstram diferentes culturas bacterianas e sua tolerância quando cultivadas em diversas condições de concentrações de NaCl, in vitro. A bactéria patogênica FNO, tem demonstrado alta resistência a diversos antibióticos testados, como apresenta os resultados do estudo realizado por RAMÍREZ-PAREDES et al. (2017), os autores afirmaram que dentre os antibióticos testados, FNO apresentam resistência a vários antibióticos, dentre eles a ampicilina e amoxicilina, e sensibilidade a diversos antibióticos,

gentamicina e tetraciclina. No entanto, um outro estudo apresentado por Soto et al. (2012), demonstram resultados de sensibilidade aos antibióticos testados nesse trabalho, em que esta cepa se mostrou resistente aos testes, não formando halos de inibição

• **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A bactéria patógena *Francisella noatunensis* sp. *orientalis*, analisada neste presente estudo, desenvolvem-se melhor quando cultivadas em meio BHI suplementado, em temperaturas a partir de 19°C, suportando até 28°C, sendo sua melhor temperatura de crescimento 26°C. As concentrações salinas testadas, demonstram crescimento bacteriano positivo em até 3,0 g.L⁻¹, concentrações superiores impactam negativamente em seu desenvolvimento bacteriano. As análises do antibiograma demonstraram alta resistência aos antibióticos testados, formando halo de inibição somente no disco de gentamicina (10µg por disco).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOTELHO, A. H.; MOURAD, M. N. N.; FERREIRA, E. M. S. A.; HERNANDES, L. M.; MELO, C. V. C. *FRANCISELLA* sp. – UMA REVISÃO. Revista Científica De Medicina Veterinária, [S. l.], v. 25, p. 1679–7353, 2015

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

Kamaishi T, Miwa S, Goto E, Matsuyama T: Mass mortality of giant abalone *Haliotis gigantea* caused by a *Francisella* sp. bacterium. Dis Aquat Organ 2010, 89:145-154.

Mikalsen J, Olsen AB, Tengs T, Colquhoun DJ: *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Int JSyst Evol Microbiol* 2007, 57:1960-1965.

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* [S. l.], v.19, n.1, p. 27-34, 2007. DOI:10.1577/H06-025.1.

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

NÓBREGA, Rafaela Simão Abrahão et al. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade in vitro. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, n. 4, p. 899-905, 2004.

Nylund A, Ottem KF, Watanabe K, Karlsbakk E, Krossoy B: *Francisella* sp. (Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. *ArchMicrobiol* 2006, 185:383-392.

OTTEM, K. F. et al. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al.(2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov.[syn. *Francisella piscicida* Ottem et al.(2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *Journal of applied microbiology*, v. 106, n. 4, p. 1231-1243, 2009.

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

Piaskowski, C. A., Yamanaka, E. H. U., & Romanel, M. (2007). Manual para

antibiograma. Técnica de difusão por disco. Laborclin produtos para laboratórios Ltda. Pinhais-PR

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

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

RAMÍREZ-PAREDES, José G. et al. A Polyphasic Approach for Phenotypic and Genetic Characterization of the Fastidious Aquatic Pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 2324, 2017.

REZGUI, Raja et al. *Anaerosalibacter bizertensis* gen. nov., sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 62, n. 10, p. 2469-2474, 2012.

Soto, E., Griffin, M., Wiles, J., and Hawke, J. P. (2012). Genetic analysis and antimicrobial susceptibility of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (syn. *F. asiatica*) isolates from fish. *Vet. Microbiol.* 154, 407–412. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.07.030

Soto E, Hawke JP, Fernandez D, Morales JA: *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *J Fish Dis* 2009, 32:713-722

ZAMPIERI, Maria Emília. Tilápia deve alcançar 80% do mercado de peixes de cultivo no Brasil até 2030. Globo Rural, Vinhedo-SP, 28 fev. 2023. Peixe. Disponível em: <https://globorural.globo.com/pecuaria/peixe/noticia/2023/02/tilapia-deve-alcancar-80percent-do-mercado-de-peixes-de-cultivo-no-brasil-ate-2030.ghtml> Acesso em: 19 dez. 2023.