



*Desenvolvimento e validação de uma ferramenta molecular de multiplex-PCR para a deteção de Vibrio alginolyticus, Vibrio anguillarum e Vibrio harveyi em peixes de aquacultura*

**Ana Rita Carvalho Ferreira**

2018





***Desenvolvimento e validação de uma ferramenta molecular de multiplex-PCR para a deteção de Vibrio alginolyticus, Vibrio anguillarum e Vibrio harveyi em peixes de aquacultura***

Ana Rita Carvalho Ferreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação realizada sob a orientação da Doutora Clélia Afonso e da Especialista Teresa Baptista

2018



Título: Desenvolvimento e validação de uma ferramenta molecular de multiplex-PCR para a deteção de *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* e *Vibrio harveyi* em peixes de aquacultura

Copyright © Ana Rita Carvalho Ferreira

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2018

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais e à minha irmã por me apoiarem em todas as decisões que fui tomando ao longo da minha vida e por sempre me incentivarem a tomar os melhores rumos, eles são o meu maior pilar e sem eles nada disto teria sido possível.

Às minhas orientadoras, professora Clélia Afonso e professora Teresa Baptista que foram incansáveis comigo, mostrando-se sempre preocupadas com o meu trabalho e disponíveis, ajudando-me em qualquer circunstância.

Aos meus meninos, Henrique Pinto, João Reis, Rodrigo Correia e Simão Maia, por me terem dado guarida durante uma parte da realização da minha tese e principalmente pela amizade e paciência que sempre tiveram comigo.

À Beatriz Trindade e à Cláudia Lopes, que sempre me acompanharam durante estes anos e me ajudaram a ultrapassar todos os obstáculos, obrigada por fazerem parte da minha vida e por poder contar sempre com vocês.

À Joana Ribeiro e ao Marco Simões, que me ajudaram em muitas das dificuldades que encontrei ao longo deste caminho, principalmente na parte de Biologia Molecular, à Adriana Januário por me ter transmitido muitos conhecimentos na parte de Microbiologia e ao Pedro Pires por me ajudar em toda a parte de Aquacultura que envolveu sobretudo a infeção dos linguados.

Por último e não menos importante, à família CETEMARES que me recebeu de braços abertos e sempre esteve lá para mim nos melhores e piores momentos.

Muito obrigada a todos!!!



## **Resumo**

O sector aquícola tem crescido largamente nos últimos anos, devido à procura crescente de alimento em todo o mundo e à diminuição dos recursos pesqueiros. Contudo, a presença de doenças infecciosas é uma constante ameaça podendo resultar em enormes perdas económicas neste setor. Algumas dessas doenças são causadas por bactérias, entre as quais se incluem espécies do género *Vibrio*. A criação de métodos de deteção prévia da presença destas bactérias em aquaculturas, como forma de prevenir potenciais surtos com consequências graves, é de uma importância extrema. O PCR é uma ferramenta molecular que permite a deteção rápida e específica destes agentes patogénicos, sendo utilizada neste tipo de situações com sucesso.

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar uma ferramenta molecular de multiplex-PCR que permita a deteção precoce da presença de *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi* e *Vibrio alginolyticus*, três dos agentes patogénicos que causam perdas avultadas em aquaculturas. As condições reacionais do multiplex PCR foram otimizadas de forma a estabelecer as condições de utilização desta ferramenta de forma eficaz, sensível e rigorosa. Foram utilizados 35 ciclos na amplificação, a temperatura de *annealing* ótima é de 58°C e a concentração ideal de MgCl<sub>2</sub> é de 7,5 mM. Os resultados indicam que a extração de ADN deve ser efetuada com kits apropriados, pois o método de fervura não se mostra suficientemente eficaz. Validou-se com sucesso a ferramenta em tecidos de linguados (*Solea senegalensis*) provenientes de aquacultura, tendo sido assim validada a utilização desta técnica na deteção precoce das espécies de *Vibrio* estudadas, em condições reais de uma aquacultura. Esta ferramenta molecular é importante, especialmente quando se suspeita que existem múltiplas infeções derivadas de diferentes agentes patogénicos, podendo a sua aplicação em aquacultura comercial revelar-se essencial.

Palavras-chave: *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, multiplex-PCR, *Solea senegalensis*



## **Abstract**

The aquaculture sector has grown significantly in the last years due to the increasing demand for food around the world and the decline in fish resources. However, the presence of infectious diseases is a persistent threat and could result in huge economic losses in this sector. Some of these diseases are caused by bacteria, including species of the genus *Vibrio*. The development of methods for detecting the presence of these bacteria in aquaculture as a means of preventing potential outbreaks with serious consequences is of extreme importance. PCR is a molecular tool that allows the rapid and specific detection of these pathogens, being used in this type of situations with success.

The objective of this study was to develop and validate a molecular multiplex PCR tool that allows the early detection of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus*, three of the pathogens that cause large losses in aquaculture. The reactive conditions of the PCR multiplex were optimized in order to establish the conditions of use of this tool in an efficient, sensitive and rigorous way. Thirty five cycles were used in the amplification, an optimum annealing temperature of 58°C and the ideal concentration of MgCl<sub>2</sub> of 7.5 mM. The results indicate that DNA extraction must be performed with appropriate kits, since the boiling method is not sufficiently effective. The tool was successfully validated in aquaculture sole (*Solea senegalensis*) tissues and validated the use of this technique in the early detection of the studied *Vibrio* species under real aquaculture conditions. This molecular tool is important especially when it is suspected that there are multiple infections derived from different pathogens your application in commercial aquaculture is essential.

Keywords: *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, multiplex-PCR, *Solea senegalensis*



# Índice de matérias

<b>Agradecimentos</b> .....	vii
<b>Resumo</b> .....	ix
<b>Abstract</b> .....	xi
<b>Índice de matérias</b> .....	xiii
<b>Índice de figuras</b> .....	xv
<b>Índice de tabelas</b> .....	xvii
<b>Índice de abreviaturas, siglas e símbolos</b> .....	xix
<b>1.Introdução</b> .....	1
1.1. Panorama do Sector da Aquacultura .....	3
1.2. <i>Vibriose</i> .....	4
1.3. Técnicas de deteção de agentes patogénicos bacterianos .....	8
1.4. Reacção em cadeia da Polimerase (PCR).....	9
1.5. Multiplex- PCR.....	9
Objetivo Geral .....	11
Objetivos secundários .....	11
<b>2.Metodologia</b> .....	13
2.1. Estirpes bacterianas e condições de cultura.....	15
2.2. Curvas de correlação entre os valores de absorvância e UFC .....	15
2.3. Primers utilizados .....	15
2.4. Extração de ADN bacteriano, reacção em cadeia da polimerase (PCR) e multiplex-PCR.....	16
2.5. Sensibilidade da ferramenta de multiplex-PCR .....	17
2.6. Infecção <i>in vitro</i> de tecidos de peixes com culturas bacterianas puras de <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> e <i>Vibrio harveyi</i> .....	18
2.7. Sensibilidade da ferramenta de multiplex-PCR em tecidos .....	18
2.8. Validação da ferramenta.....	19
<b>3.Resultados</b> .....	21
3.1. Amplificação por PCR em <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> e <i>Vibrio harveyi</i> .....	23
3.2. Multiplex - PCR .....	24
3.3. Sensibilidade da ferramenta de multiplex - PCR .....	25
3.4. Multiplex - PCR em tecidos .....	26
3.5. Sensibilidade do multiplex - PCR em tecidos .....	27
3.6. Validação da ferramenta.....	29
<b>4.Discussão</b> .....	31

<b>5.Conclusões e Perspetivas Futuras .....</b>	<b>39</b>
<b>6.Referências bibliográficas.....</b>	<b>43</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>51</b>

## Índice de figuras

Figura 1.1.1 - Produção total mundial das pescas e aquacultura em milhões de toneladas .....	3
Figura 1.1.2 - Perspetivas sobre o consumo e produção de aquacultura e capturas pesqueiras.....	4
Figura 3.1.1 - PCR de três microrganismos. M- marcador de 200pb; 1- <i>Vibrio alginolyticus</i> ; 2- <i>Vibrio harveyi</i> ; 3- <i>Vibrio anguillarum</i> (primer vah1); 4- <i>Vibrio anguillarum</i> (primer rpo) ....	23
Figura 3.2.1 - m-PCR com diferentes temperaturas de <i>annealing</i> e diferentes métodos de extração. M- Marcador de 200 pb; 1- Fervura e 55°C; 2- Fervura e 57°C; 3- Fervura e 59°C; 4- Kit e 55°C; 5- Kit e 57°C; 6- Kit e 59°C.....	24
Figura 3.2.2 - m-PCR com diferentes concentrações de MgCl <sub>2</sub> . M- Marcador de 200 pb; 1- 1,5mM; 2-2,5mM; 3- 5mM; 4 – 7,5mM .....	25
Figura 3.3.1 - Sensibilidade de m-PCR com diluições decimais sucessivas. M- Marcador de 200 pb; 1- 100 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias; 2- 10 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias; 3- 1 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias; 4- 0,1 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias; 5-0,01 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias; 6-0,001 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias .....	26
Figura 3.4.1 - Spiking no fígado, baço, rim e plasma de linguado saudável. M- Marcador de 200 pb. 1- Fígado inoculado com <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 2- Baço inoculado com <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 3 – Rim inoculado com <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 4- Plasma inoculado com <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 5- Controlo negativo de fígado; 6- Controlo negativo de baço; 7 – Controlo negativo de rim; 8- Controlo negativo de plasma.....	27
Figura 3.5.1 – Sensibilidade do m-PCR em fígado e baço. M- Marcador de 200pb. 1- Fígado com 10 <sup>8</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 2- Fígado com 10 <sup>7</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 3- Fígado com 10 <sup>6</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 4 - Fígado com 10 <sup>5</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 5- Fígado com 10 <sup>4</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 6- Controlo negativo de fígado; 7- Baço com 10 <sup>8</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 8 - Baço com 10 <sup>7</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 9- Baço com 10 <sup>6</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 10 - Baço com 10 <sup>5</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 11 - Baço com 10 <sup>4</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 12 - Controlo negativo de baço.....	28
Figura 3.5.2 – Sensibilidade do m-PCR em rim e plasma. M- Marcador de 200pb. 1- Rim com 10 <sup>8</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 2- Rim com 10 <sup>7</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 3- Rim com 10 <sup>6</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e <i>V.harveyi</i> ; 4 - Rim com 10 <sup>5</sup> UFCmL <sup>-1</sup> de <i>V. alginolyticus</i> , <i>V.anguillarum</i> e	

*V.harveyi*; 5- Rim com  $10^4$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 6- Controlo negativo de rim; 7- Plasma com  $10^8$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 8 – Plasma com  $10^7$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 9- Plasma com  $10^6$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 10 – Plasma com  $10^5$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 11 – Plasma com  $10^4$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 12 - Controlo negativo de plasma.....28

Figura 3.6.1 – Validação da ferramenta molecular em ADN extraído de tecidos (fígado, baço e rim) de 2 indivíduos que morreram durante a infeção. M- Marcador de 200 pb. 1- Fígado do indivíduo 1; 2- Baço do indivíduo 1; 3 – Rim do individuo 1; 4 – Fígado do individuo 2; 5 – Baço do individuo 2. .... 29

Figura 3.6.2 – Confirmação da presença da bactéria *V. alginolyticus*, em tecidos (fígado, baço e rim) de 2 indivíduos que morreram durante a infeção, extraída através de riscado feito em placas de TSA+ 1% NaCl. M- Marcador de 200 pb. 1- *V. alginolyticus* extraído do fígado do indivíduo 1; 2- *V. alginolyticus* extraído do baço do indivíduo 1; 3 – *V. alginolyticus* extraído do rim do individuo 1; 4 – *V. alginolyticus* extraído do fígado do individuo 2; 5 – *V. alginolyticus* extraído do baço do individuo 2.....30

## **Índice de tabelas**

Tabela 1.2.I- Tabela referente aos organismos afetados e sintomas causados pelas bactérias, <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> e <i>Vibrio harveyi</i> .....	7
Tabela 2.4.II – Quantidade de reagentes e temperaturas de <i>annealing</i> utilizadas para as reações de PCR e de multiplex-PCR.....	17



## **Índice de abreviaturas, siglas e símbolos**

BSA – Bovine Serum Albumin – Albumina de soro bovino

DMSO – “Dimethyl sulfoxide” – Sulfóxido de Dimetilo

FAO – “Food and Agriculture Organization” – Organização para a Alimentação e Agricultura

M-PCR – “multiplex-PCR” – Múltiplas Reações em Cadeia da Polimerase

PCR – “Polimerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase

TSA – “Tryptone Soya Agar”

TSB – “Tryptone Soya Broth”

UFC – Unidades Formadoras de Colónia



# **1. Introdução**



## 1.1. Panorama do Setor da Aquacultura

A aquacultura tem sofrido um rápido desenvolvimento em todo o mundo nos últimos 30 anos (Sorrosa *et al.*, 2012). A produção aquícola mundial em 2014 foi de aproximadamente 73,8 milhões de toneladas, o que representa aproximadamente 10 milhões de toneladas a mais em relação a 2011 (FAO, 2016). Em relação à soma das capturas pesqueiras e à produção aquícola, o total atingido foi de aproximadamente 167 milhões de toneladas, cerca de 10 milhões a mais do que em 2012 (figura 1.1.1) (FAO, 2016). A origem deste aumento está no rápido crescimento da aquacultura, incluindo as atividades dos pequenos produtores (FAO, 2016).

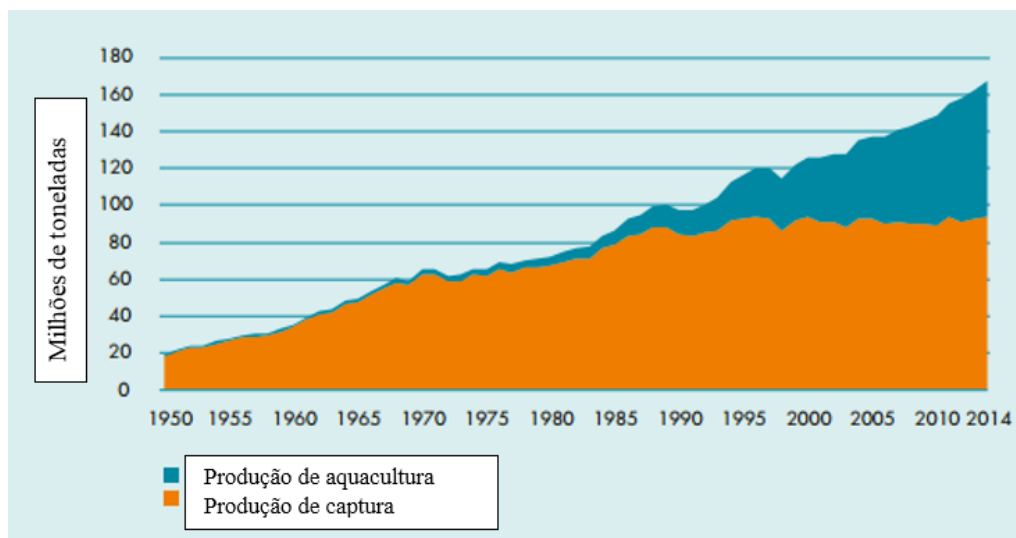


Figura 1.1.1 - Produção total mundial das pescas e aquacultura em milhões de toneladas

Apesar deste incremento, a produção mundial total da pesca (captura e aquacultura) deverá continuar a aumentar, atingindo 196 milhões de toneladas em 2025. Assim, e de acordo com a figura 1.1.2, a contribuição da aquacultura, na produção total de pescado, poderá crescer de 44% para 52 % em 2025. Este desenvolvimento destaca uma nova era, indicando que a aquacultura será o principal motor de mudança no sector das pescas e da aquacultura, sendo que paralelamente irá aumentar o consumo de peixe de aquacultura de 50 % para 57 % em 2025 (FAO, 2016).

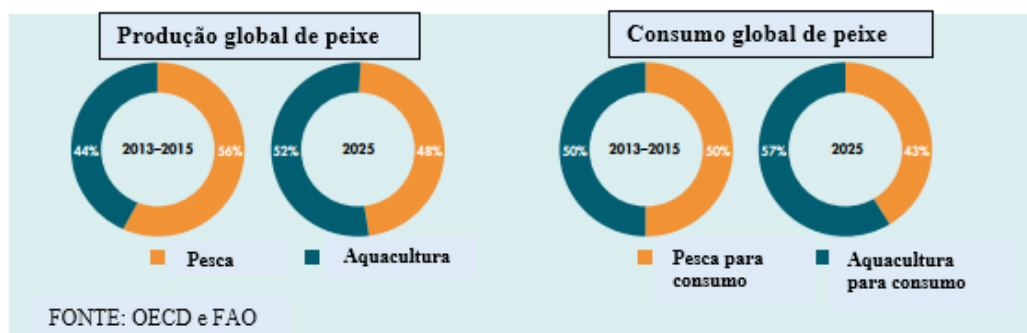


Figura 1.1.2 - Perspetivas sobre o consumo e produção de aquacultura e capturas pesqueiras

No sul da Europa, o cultivo de robalo (*Dicentrarchus labrax*), dourada (*Sparus aurata*) e linguado (*Solea senegalensis*) são de grande importância, enquanto a cultura da corvina (*Argyrosomus regius*) apenas foi introduzida há relativamente pouco tempo (Sorroza *et al.*, 2012). A presença de doenças infecciosas é uma constante ameaça nas aquaculturas comerciais podendo resultar em enormes perdas económicas neste setor (Sorroza *et al.*, 2012). De salientar que, um grupo relativamente reduzido de agentes patogénicos é responsável por grandes perdas económicas em todo o mundo em peixes cultivados, sendo que as bactérias da família Vibrionaceae se incluem neste grupo (Toranzo *et al.*, 2005). Os microrganismos em causa são essencialmente agentes patogénicos oportunistas que invadem os tecidos de um peixe hospedeiro quando este se torna suscetível à infeção devido a fatores de stresse ambientais ou outros processos patológicos (Roberts, 2004).

## 1.2. *Vibriose*

A *Vibriose* é uma doença causada por bactérias que pertencem ao género *Vibrio*, e é uma das mais importantes e antigas doenças marinhas reconhecidas em aquacultura a nível mundial (Gonzalez *et al.*, 2003). O género *Vibrio* abrange mais de 70 espécies, sendo um dos géneros bacterianos mais abundantes no ambiente marinho (Damir *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). São bactérias gram-negativas, halófilas, anaeróbias facultativas e apresentam uma forma curva ou em haste (Wei *et al.*, 2014; Vincent *et al.*, 2015). Apresentam variação sazonal nos níveis populacionais e estão amplamente distribuídas tanto em habitats estuarinos como marinhos (Damir *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2014). Existem alguns fatores importantes que induzem esta doença, onde se incluem o stresse químico (qualidade da água, poluição, composição da dieta), stresse biológico (densidade populacional e presença de microrganismos) e stresse físico (temperatura) (Frans *et al.*, 2011). No que diz respeito à temperatura e salinidade, sabe-se que temperaturas e salinidades mais elevadas despoletam um rápido crescimento de

*Vibrio* sp., e por outro lado temperaturas e salinidades mais baixas inibem o seu crescimento (Vicente *et al.*, 2015).

Sabe-se também que os surtos de vibriose apenas surgem quando a temperatura da água excede os 15°C (Frans *et al.*, 2011). A maior parte destas bactérias são patogénicas para animais marinhos, como camarões, moluscos e peixes ósseos (Wei *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio ordalii* e *Vibrio vulnificus* são considerados agentes patogénicos oportunistas de peixes (Zhang *et al.*, 2014), surgindo apenas em situações de stresse que poderão advir de situações ambientais desfavoráveis (Ghittino *et al.*, 2003).

O *Vibrio harveyi* apesar de não ser incluído entre os principais patógenos de peixes tem sido cada vez mais relacionado com as infeções de peixes ornamentais e peixes produzidos em aquacultura (Austin, 2010). Esta espécie também foi reportada como sendo um potencial agente patogénico para a maioria dos animais marinhos vertebrados e invertebrados (Haldar *et al.*, 2010). Os sintomas associados a esta doença são a desorientação, letargia, perda de apetite, desenvolvimento de cistos necróticos, vasculite e lesões oculares que posteriormente podem provocar exoftalmia (Xu *et al.*, 2017). Esta bactéria está também associada à vibriose luminosa nos camarões, pois esta bactéria tem a capacidade de apresentar luminescência (Dash *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017). Para agravar esta situação, o mecanismo causador de doença, por *Vibrio harveyi* ainda não está conhecido e nenhum método eficaz está disponível para controlar a sua propagação e desenvolvimento, e daí ser essencial encontrar uma ferramenta de diagnóstico expedita e que apoie a abordagem profilática (Xu *et al.*, 2017). Para além disto, também tem sido registado nos últimos anos o surgimento de resistências neste *Vibrio*, devido ao uso excessivo de antibióticos para prevenir estas doenças bacterianas em sistemas de aquacultura (Dashtiannasb & Yeganeh, 2017; Lal *et al.*, 2017).

O *Vibrio anguillarum* reconhecido como *Listonella anguillarum* (Frans *et al.*, 2011) é uma bactéria que cresce rapidamente em temperaturas entre os 25°C e os 30°C, em meios enriquecidos com 1.5-2.0 % de cloreto de sódio (Frans *et al.*, 2011). Este *Vibrio* pode ocorrer como uma doença crónica, ou seja, sem manifestações visíveis, ou então poderá ocorrer como uma septicemia hemorrágica letal para os organismos sensíveis (Hong *et al.*, 2007; Mosca *et al.*, 2014; Hickey *et al.*, 2015). Os peixes expostos a este *Vibrio* sofrem elevada mortalidade, uma vez que os são muito graves (hemorragia severa, formação de úlceras e furúnculos na pele, eritemas e anemia) (Hickey *et al.*, 2015), resultando assim na elevada mortalidade dos indivíduos afetados. Para além disto, este *Vibrio* tem a capacidade de apresentar vários mecanismos de patogenicidade, conseguindo penetrar na pele dos organismos, segregando

inúmeras proteínas com potencial proteolítico que causam danos na pele, ficando assim essa barreira danificada (Weber *et al.*, 2010; Hickey *et al.*, 2015). Esta bactéria é encontrada em altas concentrações no sangue e tecidos hematopoiéticos (Frans *et al.*, 2011).

Por último, *Vibrio alginolyticus* é o único de entre as três espécies de *Vibrio* referidas que é reconhecida como um agente patogénico humano e que foi registado em surtos relacionados com a ingestão de água e marisco que provocaram infeções gastrointestinais (Damir *et al.*, 2013). Os estudos mostram que o *Vibrio alginolyticus* é considerado uma das espécies que mais frequentemente persiste livremente na água e sedimentos e pode sobreviver na água do mar, mesmo em condições de stresse nutricional, mantendo a sua virulência (Mustapha *et al.*, 2013). Os sintomas de doenças causadas por este *Vibrio* em peixes teleósteos incluem: septicemia, hemorragia, pele escura e úlceras na superfície da pele em alguns casos, muito idêntico ao *Vibrio anguillarum*, internamente, o peixe acumula fluido na cavidade peritoneal e, em alguns casos, surgem fígados hemorrágicos (Balebona *et al.*, 1998).

De um modo geral, os sintomas provocados por esta doença caracterizam-se externamente por hemorragias na base das barbatanas peitorais, olhos infetados que inicialmente exibem opacidade e mais tarde exoftalmia, perda de apetite e consequentemente de peso, letargia e lesões na superfície do corpo que podem ulcerar (Frans *et al.*, 2011). A nível interno, os intestinos podem estar distendidos e preenchidos com um líquido transparente e viscoso, devido ao gradiente de pH no trato gastrointestinal que se manifesta mais na parte do reto e parte posterior do trato gastrointestinal. Quando a doença se manifesta em epizootias agudas, a infeção espalha-se tão rapidamente que os peixes infetados morrem sem sequer mostrarem sinais clínicos externos (Frans *et al.*, 2011). Este agente patogénico encontra-se essencialmente em altas concentrações no sangue, tecidos hematopoiéticos (rim e baço), pele e fígado, podendo surgir muitas das vezes, fígados hemorrágicos (Balebona *et al.*, 1998; Frans *et al.*, 2011; Amar *et al.*, 2017).

A utilização inadequada de antibióticos e o seu uso prolongado causa resistência em inúmeras espécies de agentes patogénicos, sendo que muitos desses patógenos que anteriormente eram suscetíveis aos antibióticos, hoje em dia, apresentam resistência (Loureiro *et al.*, 2016). Como já foi referido o *Vibrio harveyi* é uma das bactérias que nos últimos anos tem apresentado casos de resistência, devido ao uso excessivo de antibióticos (Dashtiannasb & Yeganeh, 2017; Lal *et al.*, 2017). Para minimizar o uso de antibióticos e garantir um crescimento sustentável da indústria da aquacultura, existem medidas alternativas que podem e devem ser tomadas. Estas medidas incluem a, utilização de probióticos, vacinação, estratégias de imunestimulação e utilização de peptídeos antimicrobianos, entre outras (Frans *et al.*,

2011). Tem-se assistido a um crescente investimento da investigação nesta área (Frans *et al.*, 2011; Sorroza *et al.*, 2012). Em relação às estratégias de controlo utilizadas para combater este tipo de microrganismos, salienta-se a vacinação e a quimioterapia (Sorroza *et al.*, 2012). Na tabela abaixo encontram-se três das espécies de *Vibrio* que mais afetam as aquaculturas, sendo descrito em que organismos foram encontrados, tipo de sintomas registados e a respetiva referência bibliográfica. A elevada quantidade de organismos afetados por estas bactérias reflete que os organismos do género *Vibrio* apresentam a capacidade de se adaptar rapidamente a mudanças das condições ambientais devido à sua elevada plasticidade genética e fenotípica (Mustapha *et al.*, 2013).

Tabela 1.2.I - Tabela referente aos organismos afetados e sintomas causados pelas bactérias, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* e *Vibrio harveyi*.

	<b>Espécie afetada</b>	<b>Sintomas</b>	<b>Referência</b>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Sparus aurata</i>	Septicemia	Austin (2010); Abdel-Aziz <i>et al.</i> (2013); Damir <i>et al.</i> (2013)
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Não foram registados sintomas	Abdel-Aziz <i>et al.</i> (2013); Damir <i>et al.</i> (2013)
	<i>Epinephelus malabaricus</i>	Exoftalmia e opacidade da córnea	Austin (2010)
	<i>Rachycentron canadum</i>	Ascite, letargia e melanose	Austin (2010)
<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Hemorragias na barbatana basal e boca, erosão caudal e hemorragias internas	Mosca <i>et al.</i> (2014); Balta (2016); Crisafi <i>et al.</i> (2011); Álvarez <i>et al.</i> (2016)
	<i>Sparus aurata</i>	Não foram registados sintomas	Canak, (2011)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Excesso de muco, hemorragias no fígado e barbatanas e exoftalmia	Weber <i>et al.</i> (2010); Avci <i>et al.</i> (2012)
	<i>Sparus aurata</i>	Erosão da cauda, lesões dérmicas, natação à superfície e septicémia hemorrágica	Pujalte <i>et al.</i> (2003); Haldar <i>et al.</i> (2010)

<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Não foram registados sintomas	Pujalte <i>et al.</i> (2003)
	<i>Centropomus undecimalis</i>	Córneas brancas opacas	Austin (2010)
	<i>Caranx hippos</i>	Lesões dérmicas profundas	Austin (2010)
	<i>Mola mola</i>	Lesões oculares	Austin (2010)
	<i>Solea senegalensis</i>	Úlceras na pele e hemorragias ao redor da boca e barbatanas	Austin (2010); Medina <i>et al.</i> (2015)

Geralmente os Vibrionaceae são detetados utilizando um meio seletivo, tal como TCBS (agar de tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose) no entanto, este método não permite distinguir as diferentes espécies de *Vibrio* e não é um método expedito (Kim & Lee, 2014). Para além disso, sabe-se que a identificação precisa de diferentes espécies do género *Vibrio* é problemática, principalmente quando se tratam de espécies aparentadas (Kwok *et al.*, 2002), nomeadamente devido à variabilidade das características bioquímicas, o que complica então a identificação fenotípica destas bactérias (Nhung *et al.*, 2007). Nas últimas décadas as, técnicas moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real, microarrays, amplificação baseada em sequências de ácidos nucleicos (NASBA) e amplificação isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP) (Nhung *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Hickey *et al.*, 2015) têm sido cada vez mais utilizadas na deteção de agentes patogénicos. A convencional reação em cadeia da polimerase (PCR) fornece uma análise rápida, específica e sensível dos *Vibrio* alvo, mas não permite a obtenção de medições quantitativas e não distingue células mortas de células vivas. Em comparação com o PCR convencional, o método de PCR em tempo real quantitativo é mais rápido, e cerca de 100 vezes mais sensível, para além de permitir a quantificação das cópias de ADN presentes na amostra em estudo (Kim & Lee, 2014), mas tem um custo muito elevado e a sua implementação na prática real de uma aquacultura revela-se difícil.

### 1.3. Técnicas de deteção de agentes patogénicos bacterianos

Devido à franca expansão do sector aquícola, como é visível pela figura 1.1.1, aliada à falta de ferramentas de combate eficazes, são cada vez mais frequentes as infeções bacterianas em aquaculturas, para controlar este tipo de infeções é necessário o desenvolvimento de

métodos sensíveis, rápidos e robustos, que permitam detecção e identificação precoce dos microrganismos patogénicos (Kong *et al.*, 2002). Como agravante, muitos destes patógenos apresentam características morfológicas comuns e os mesmos sinais clínicos são desenvolvidos por diversas doenças distintas (Zhang *et al.*, 2014). Tradicionalmente a detecção é feita através de técnicas microbiológicas clássicas, com o crescimento de culturas de bactérias em placas com meio seletivo, sendo de seguida feita a caracterização fenotípica e serológica do agente patogénico (Altinok *et al.*, 2008). Para além disto, também têm sido utilizados testes bioquímicos, homologia do ADN e técnicas de variabilidade da protease, contudo estas técnicas apresentam diversas desvantagens, tais como a baixa sensibilidade quando se trata de detetar baixos níveis de agente patogénico e a necessidade de isolamento inicial do organismo. (Kong *et al.*, 2002; Altinok *et al.*, 2008; Altinok, 2011).

#### **1.4. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) poderá ser utilizada para resolver este tipo de problemas e aumentar a sensibilidade e especificidade na detecção dos agentes patogénicos (Altinok, 2011; Shi *et al.*, 2012). Para além disso, os métodos moleculares forneceram avanços significativos em relação aos métodos convencionais, nomeadamente, para a identificação e diferenciação de espécies intimamente relacionadas (Nhung *et al.*, 2007). O PCR é uma ferramenta molecular cada vez mais utilizada devido às vantagens económicas, poupança de tempo e elevada sensibilidade, apresentando o potencial de produzir milhões a biliões de cópias de um produto específico para diversos fins, tais como, sequenciação, clonagem e análise (Garibyan & Avashia, 2014).

No entanto, até mesmo a utilização do PCR clássico tem algumas desvantagens associadas, pois, é necessário um grande número de reações quando se pretende detetar diferentes tipos de agentes patogénicos em várias amostras, tornando o processo moroso e relativamente dispendioso (Altinok *et al.*, 2008; Altinok, 2011). Surge assim, o multiplex PCR (m-PCR) que permite a detecção simultânea de vários agentes patogénicos (Kong *et al.*, 2002; Altinok, 2011).

#### **1.5. Multiplex- PCR**

A reação em cadeia da polimerase em multiplex, designado vulgarmente multiplex-PCR (m-PCR), é um tipo de PCR no qual duas ou mais sequências alvo podem ser amplificadas em

simultâneo, através da inclusão de mais do que um par de oligonucleotídeos de amplificação (primers) na reação. Este tipo de PCR é vantajoso quando se pretende gerir o tempo e recursos em laboratório (Markoulatos *et al.*, 2002), assim como, reduzir os gastos em reagentes, sem comprometer os resultados (Alves *et al.*, 2016).

Esta ferramenta molecular foi descrita pela primeira vez em 1988 e desde então tem sido aplicada em diversas áreas, particularmente no que diz respeito à deteção de doenças infecciosas, tanto em bactérias, como vírus ou parasitas. Como todas as técnicas moleculares esta apresenta limitações, nomeadamente a nível da sensibilidade e especificidade, assim como a amplificação preferencial de determinados objetivos específicos (Markoulatos *et al.*, 2002). Além disso, a presença de mais do que um par de primers na mistura reacional aumenta a probabilidade de obtenção de produtos de amplificação não pretendidos. O funcionamento ótimo do multiplex-PCR depende de quantidade de primers, concentrações de MgCl<sub>2</sub> e dNTP's, e o respetivo balanço, da concentração e composição da solução tampão, da quantidade e pureza da amostra de ADN, da polimerase utilizada e ainda o uso de adjuvantes, tais como o DMSO, glicerol e BSA.

Devido à necessidade de detetar cada vez mais cedo os problemas associados às doenças/infeções que causam elevadas mortalidades nos peixes de aquacultura, também nesta área tem havido investimento em estudos onde se utiliza a técnica de multiplex-PCR. Em 2007, Nhung e colaboradores descreveram no seu trabalho o desenvolvimento de reações de multiplex-PCR utilizando o gene de hemolisina (*hly*) para a deteção simples e rápida de *Vibrio campbellii*, *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*. Este tipo de trabalho permitiu o desenvolvimento de um método simples, rápido e económicos para diferenciar estas espécies estreitamente relacionadas, sendo muito eficaz do ponto de vista epidemiológico, ecológico e económico. Em 2011, Tapia-Cammas e colaboradores desenvolveram uma ferramenta de multiplex-PCR para deteção de agentes patogénicos em salmão de aquacultura tendo como alvos *Streptococcus phocae*, *Aeromonas salmonicida*, *Piscirickettsia salmonis* e *Vibrio anguillarum*. Zhang e colaboradores, em 2014, desenvolveram um multiplex-PCR para a deteção rápida e simultânea de quatro géneros diferentes de patogénicos de peixes. Estes géneros são *Aeromonas*, *Vibrio*, *Edwardsiella* e *Streptococcus* que causam frequentemente perdas severas em aquaculturas comerciais. Com o desenvolvimento desta ferramenta específica para cada género, é possível detetar cada uma destas bactérias de 4 diferentes géneros, quando presentes em amostras, permitindo a discriminação de cada uma delas. É esperado que esta abordagem seja capaz de identificar mais eficientemente que o PCR simples ou até mesmo o multiplex-PCR específico para espécies e que resulte na implementação de medidas precoces de deteção deste tipo de

problemas em aquaculturas comerciais. Mais recentemente, em 2017, Pinto e colaboradores, desenvolveram uma ferramenta molecular, multiplex-PCR para a detecção simultânea de 4 patógenos de peixes, sendo eles, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillaum*, *Vibrio harveyi* e *Edwardsiella tarda*. Estes agentes patogénicos podem causar estragos e perdas gigantescas em aquaculturas, sendo por isso fundamental a sua detecção rigorosa e prévia que esta ferramenta tem a capacidade de oferecer. Contudo, em estudos futuros os autores defendem que a ferramenta tem de ser testada em amostras de peixes provenientes de aquaculturas. De realçar que nenhum destes autores citados anteriormente, que desenvolveram esta ferramenta molecular, multiplex-PCR, testaram a sua aplicação em peixes infetados, fazendo a validação do multiplex-PCR.

## **Objetivo Geral**

Desenvolvimento e validação de uma ferramenta molecular que apresente rapidez, simplicidade e fiabilidade para detecção precoce de *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi* e *Vibrio alginolyticus* que causam elevadas perdas em aquaculturas, através da utilização de uma ferramenta de multiplex PCR.

## **Objetivos secundários**

- I. Otimizar o processo de extração de ADN dos agentes patogénicos em estudo
- II. Redesenhar primers e estabelecer as condições ótimas das reações de multiplex PCR.
- III. Determinar a sensibilidade e especificidade da ferramenta desenvolvida.
- IV. Testar a ferramenta em tecidos sujeitos a inoculação *in vitro*.
- V. Validar a ferramenta em tecidos de peixes (*Solea senegalensis*) infetados com *Vibrio alginolyticus*.



## **2. Metodologia**



## 2.1. Estirpes bacterianas e condições de cultura

Durante o estudo foram utilizadas 3 estirpes bacterianas distintas, todas elas pertencentes à família Vibrionaceae: *Vibrio alginolyticus* (CECT 521), *Vibrio anguillarum* (AQV 55.1) e *Vibrio harveyi* (DSM 19623). Estas bactérias foram recolhidas a partir de um stock em glicerol a 10 %, congelado a -80°C sendo que o *Vibrio anguillarum* foi fornecido pela professora Alicia E. Toranzo (Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha). Os microrganismos em estudo foram inoculados em meio TSB (Trypticase Soy Broth; VWR) suplementado com 1% de NaCl (Cloreto de Sódio; NORMAX), sendo incubados com agitação contínua a 100 rpm (Stuart SI500), overnight e a uma temperatura de 28°C. Os isolamentos de colónias foram feitos em meio TSA (Trypticase Soy Agar; VWR) suplementado com 1% de NaCl, sendo as bactérias incubadas durante 24h a 28°C (Binder).

## 2.2. Curvas de correlação entre os valores de absorvância e UFC

Para estabelecer correlação entre os valores de absorvância e a contagem das Unidades Formadoras de Colónia (UFC), as bactérias cresceram em meio TSB, sendo de seguida feitas diluições decimais seriadas até à diluição  $10^{-9}$  com solução salina a 1,5%. De cada uma das diluições decimais foi retirado um volume de 100 µl para espalhamento em placas de TSA suplementadas com 1% de NaCl (em duplicado), que se incubaram durante 24h a 28°C. Em paralelo recolheu-se 1 ml de cultura para leitura da absorvância a 600nm. Finalmente, após as 24h de crescimento, efetuou-se a contagem de UFC (Unidades formadoras de colónia) das culturas em meio semi-sólido e estabeleceu-se as correlações entre os valores de absorvância e UFC.

## 2.3. Primers utilizados

Os primers utilizados neste estudo são específicos para *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi*, sendo respetivamente ValF (5'- CTC-TCC-CAA-TTC-AGC-CCT-CTA-3') e ValR (5'- GAC-TCT-TCA-CAA-CAG-AAC-TC-3') com tamanho de amplificação esperado em 773 pb segundo Ransangan e Lal (2013) e o seu gene específico da colagenase (*accession number*:X62635) e VhF (5'- ACG-CTT-GAT-GGC-TAC-TGG-TGG-AG- 3') e VhR (5'- CTT-CGC-ACC-TGC-ATC-GG- 3') e o seu tamanho de amplificação é de 606 pb, tendo como

gene específico da hemolisina (*accession number*: GQ149070) segundo Ransangan e Lal (2013). Os dois sets de primers para o *Vibrio anguillarum* foram desenhados utilizando a ferramenta Primer-Blast disponível pela NCBI (Ye *et al.*, 2012), sendo o *primer forward* vah1F (5´- CGC-AAA-ATA-CGA-CAG-AGG-CG-3´) e o *reverse* vah1R (5´- ATT-GAG-ATG-ATC-CCC-GCA-CC-3´) que têm tamanho de amplificação esperado de 469 pb e têm como gene específico o de hemolisina vah1 (*accession number*:S83534) e rpoF (5´- ACA-ATA-AAC-CCC-GAC-AGC-GT-3´) e rpoR (5´- TAT-TTT-CAG-CGG-CCA-CCA-GT-3´) com tamanho de amplificação de 430bp e são específicos para o gene de virulência rpoN (*accession number*:U86585).

#### **2.4. Extração de ADN bacteriano, reação em cadeia da polimerase (PCR) e multiplex-PCR**

De forma a confirmar a especificidade dos primers relativamente aos agentes patogénicos em estudo foram feitas reações individuais de PCR (Bio-rad). O ADN bacteriano foi extraído com o NZY Tissue gDNA isolation kit (Nzytech genes & enzymes; ref: MB13502), no qual foi utilizado 1ml de cultura pura de cada uma das bactérias. Para comparar a eficácia de dois métodos expeditos de extração foi também extraído ADN através do método de fervura. Para tal foi colocado, 1 ml de cultura bacteriana em microtubos de 2 ml os quais foram colocados num banho a 100°C durante 10 minutos, seguido de uma centrifugação a 13200 rpm (eppendorf, 5415R) durante 10 min a 16°C, o sobrenadante obtido foi usado diretamente nas reações sem passos adicionais de purificação. A concentração (ng/µl) e pureza das amostras de ADN foi quantificada com o auxílio do Nanodrop 200 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

As reações de PCR foram realizadas com 10 µl de NZY Taq 2 × Colourless Master Mix, separate MgCl<sub>2</sub> (Nzytech genes & enzymes; ref: MB04902), 2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de cada primer e 1 µl de ADN extraído de cada uma das bactérias. Os ciclos de amplificação da reação iniciaram-se com a desnaturação a 95°C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos e extensão durante 1 minuto a 72°C. Finalmente foi feito um passo de extensão final por 10 min a 72°C.

A análise dos produtos de PCR foi efetuada por eletroforese em gel de agarose a 1.5% (w/v) (LONZA) corado com *Greensafe* (Nzytech genes & enzymes), a corrida decorreu durante 80 minutos a 80 Volts. O marcador utilizado foi o, NZYDNA *ladder 1* (Nzytech genes & enzymes) tendo sido visualizado através de um transiluminador UV – Gel Doc (Biorad).

No que diz respeito aos m-PCR's, realizou-se inicialmente um m-PCR que visava comparar os dois métodos de extração de ADN (Fervura vs Kit) em que também é possível observar a eficácia de cada um consoante a temperatura de *annealing* (55°C, 57°C e 59°C), adicionalmente efetuou-se um m-PCR que pretendia eleger a melhor quantidade/ concentração de MgCl<sub>2</sub> (0,5; 1; 2 e 3 µl, correspondente a 1,5mM, 2,5mM, 5mM e 7,5 mM). Os ciclos de PCR foram os mesmos que foram utilizados anteriormente, diferindo apenas a temperatura de *annealing*. A análise dos produtos dos m-PCR's foi efetuada exatamente da mesma forma que no PCR. As diferenças existentes nas quantidades utilizadas de NZYTaq 2 × Colourless Master Mix, separate MgCl<sub>2</sub> (Nzytech genes & enzymes; ref: MB04902), MgCl<sub>2</sub>, primers, ADN, água e na temperatura de *annealing* entre as recções de PCR e m-PCR estão indicadas na tabela 2.4.II.

Tabela 2.4. II – Quantidade de reagentes e temperaturas de *annealing* utilizadas para as reacções de PCR e de multiplex-PCR

	PCR	M-PCR
<b>Master Mix</b>	10 µl	15 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2 µl	3 µl/ 0,5, 1,2 e 3 µl
<b>Primers</b>	2 µl Forward + 2 µl Reverse	3 µl Mix de Forward e Reverse <i>V.anguillarum</i> +3 µl Mix de Forward e Reverse <i>V.alginolyticus</i> +3 µl Mix de Forward e Reverse <i>V.harveyi</i>
<b>ADN</b>	1 µl	1 µl
<b>Água</b>	2 µl	2 µl
<b>Volume total da reacção</b>	20 µl	30 µl
<b>Temperatura de <i>annealing</i> utilizada</b>	60°C	58°C / 55 °C, 57°C e 59°C

## 2.5. Sensibilidade da ferramenta de multiplex-PCR

Para aferir a sensibilidade da técnica de m-PCR foram realizadas seis diluições decimais sucessivas de amostras de ADN de concentração conhecida, sendo a primeira correspondente a uma concentração de ADN de 100 ng/µl para cada um dos *Vibrio* e a última correspondente a 1x10<sup>-3</sup> ng/µl. As condições de reacção e análise de resultados para esta etapa foram as indicadas no ponto 2.4.

## **2.6. Infecção *in vitro* de tecidos de peixes com culturas bacterianas puras de *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* e *Vibrio harveyi***

De forma a validar a ferramenta como forma de detecção precoce dos patógenos em estudo em tecidos e sangue de peixe, esta foi testada em tecidos de linguados saudáveis (*Solea senegalensis*) nomeadamente em fígado, rim, baço e no sangue. Estes tecidos e sangue foram recolhidos de indivíduos aparentemente saudáveis, que foram anestesiados com 2-fenoxietanol e o sangue foi retirado com seringas previamente heparinizadas, sendo de seguida centrifugado a 3000g durante 7 minutos, em centrífuga a 4°C, sendo o plasma recolhido para um microtubo.

De seguida, os peixes foram occisados com uma sobredose do anestésico. Em condições de assepsia, foram retirados os órgãos (rim, fígado e baço) com o auxílio de bisturi e pinça, ambos previamente esterilizados. Posteriormente, os tecidos e o plasma foram congelados (-20°C).

Relativamente às culturas bacterianas, as mesmas foram crescidas e suspensas em solução salina 1,5%, com uma turbidez equivalente à escala 4 de McFarland, correspondente teoricamente a  $1,2 \times 10^9$  células  $\text{ml}^{-1}$ .

Retiraram-se 300  $\mu\text{l}$  da suspensão e foi feita uma centrifugação a 13200 rpm durante 15 minutos à temperatura ambiente e recolheu-se apenas o pellet. A este pellet foi adicionado o seguinte: 25mg de rim ou fígado, 10mg no caso do baço ou 10  $\mu\text{l}$  de plasma. A este conjunto de bactéria com cada um dos tecidos/plasma foi adicionado também 180  $\mu\text{l}$  de buffer ATL, com o intuito de lisar as células. De seguida, o ADN total foi purificado através do Kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN).

## **2.7. Sensibilidade da ferramenta de multiplex-PCR em tecidos**

A sensibilidade da técnica de mPCR foi estimada utilizando culturas puras das bactérias em estudo. Foram realizadas 4 diluições decimais sucessivas, sendo que a primeira correspondia à diluição de  $10^8$  e a última correspondia à diluição de  $10^4$ . A concentração de primers utilizada foi de 20  $\mu\text{mol}$  e o sistema foi “GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase” (Promega), 4  $\mu\text{l}$  5×Green Go Taq Flexi Buffer, 0,4  $\mu\text{l}$  de dNTP mix, 0,1  $\mu\text{l}$  de GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase, 3  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{l}$  de cada um dos primer, 1  $\mu\text{l}$  de ADN e 5,5  $\mu\text{l}$  de água. As condições da eletroforese foram as mesmas que se utilizaram no ponto 2.4.

## 2.8. Validação da ferramenta

Para a validação da ferramenta em condições reais de utilização, foram infetados linguados (*Solea senegalensis*) com *Vibrio alginolyticus* na concentração de  $1 \times 10^6$  UFC. A três desses indivíduos (que morreram no decorrer do ensaio) foram retirados os órgãos (rim, fígado e baço), em condições de assepsia, com o auxílio de bisturi e pinça, ambos previamente esterilizados. Parte destes órgãos foi congelado ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), e o ADN foi extraído com o DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Dos restantes órgãos foi feito riscado em placa de TSA enriquecida com 1% NaCl, as placas foram incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas. As colónias obtidas foram recolhidas e o ADN foi extraído com o kit NZY Tissue gDNA isolation. Após a extração de ADN realizaram-se m-PCR's com o ADN bacteriano e com o ADN proveniente de tecidos. As reações de amplificação realizaram-se com 4  $\mu\text{l}$  5 $\times$ Green Go Taq Flexi Buffer, 0,4  $\mu\text{l}$  de dNTP mix, 0,1  $\mu\text{l}$  de GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase, 3  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{l}$  de cada um dos primer, 1  $\mu\text{l}$  de ADN extraído do tecido pretendido e 5,5  $\mu\text{l}$  de água.

As condições de amplificação e registo de resultados mantiveram-se idênticas às descritas em 2.4.



### **3. Resultados**



### 3.1. Amplificação por PCR em *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* e *Vibrio harveyi*

As reações de PCR dos três *Vibrios* (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* e *Vibrio harveyi*) deram origem aos produtos de PCR que estão representados pelas diferentes bandas que constam na figura 3.1.1. Verifica-se através da figura 3.1.1. que a banda menos nítida pertence ao *Vibrio alginolyticus* (773 pb), sendo que as restantes bandas apresentam elevada nitidez. De notar que foram realizadas duas reações distintas para a identificação do *Vibrio anguillarum* em que foram utilizados dois pares de primers distintos, o vah1 (469 pb) e o rpo (430 pb), de forma a poder identificar qual o par de primers com melhor desempenho, utilizando apenas esse nos multiplex-PCR que se irão realizar. Verifica-se através da figura apresentada que tanto o primer vah1 como o rpo se comportam de formas semelhantes com bandas bastante nítidas, tendo sido escolhido o par de primers vah1, correspondente na figura 3.1.1. à banda 3, para ser utilizado nos m-PCR que se seguem.

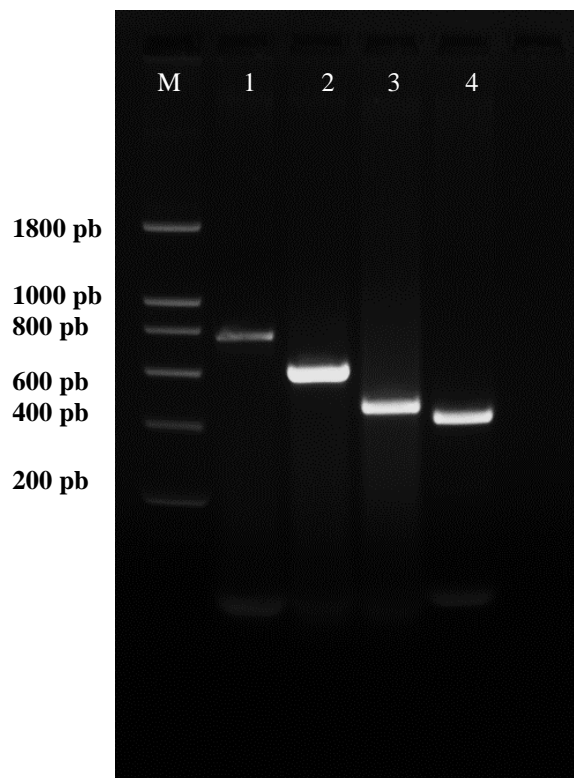


Figura 3.1.1 - PCR de três microrganismos. M- Marcador de 200pb; 1- *Vibrio alginolyticus*; 2- *Vibrio harveyi*; 3- *Vibrio anguillarum* (primer vah1); 4- *Vibrio anguillarum* (primer rpo)

### 3.2. Multiplex-PCR

Os produtos das reações de m-PCR podem ser visualizados através da figura 3.2.1, que visa comparar diferentes métodos de extração de ADN (Fervura vs NZY Tissue gDNA isolation kit), decifrando assim qual o método que apresenta melhor eficácia. Através da mesma figura também é possível comparar diferentes temperaturas de *annealing* (55°C, 57°C e 59°C) permitindo estabelecer a temperatura ideal que irá ser utilizada nos m-PCR's seguintes.

Os resultados indicam que o método de extração de ADN através do Kit é nitidamente mais eficaz que o método de extração de ADN pelo método de fervura. Neste método, apenas na temperatura de *annealing* de 57°C, aparece a banda correspondente ao *Vibrio anguillarum* (469 pb), enquanto no método de extração através do kit aparecem todas as bandas. Em relação à melhor temperatura de *annealing*, as bandas apresentam-se nítidas e bem visíveis no m-PCR onde a temperatura de *annealing* é de 55°C, correspondente à banda 4. Nestas condições, no entanto, aparecem bandas in - específicas, que à temperatura de 59°C desaparecem. A banda correspondente ao *Vibrio alginolyticus* (773 pb) é pouco visível a 59°C, pelo que se optou por utilizar nos próximos m-PCR's a temperatura de *annealing* de 58°C.

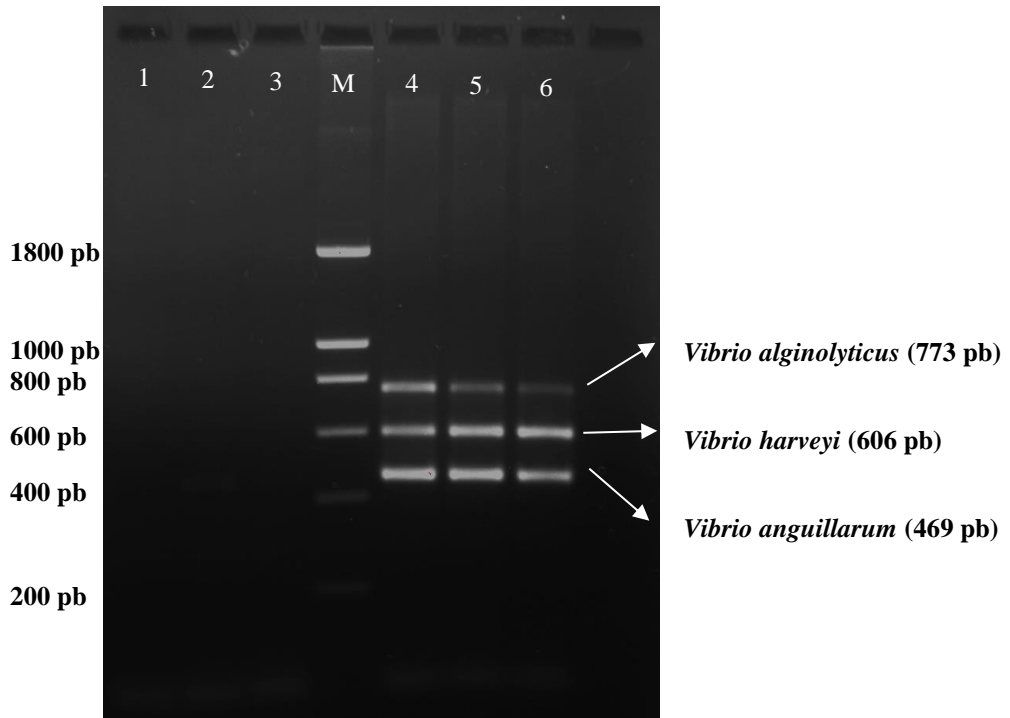


Figura 3.2.1. - m-PCR com diferentes temperaturas de *annealing* e diferentes métodos de extração. M- Marcador de 200 pb; 1- Fervura e 55°C; 2- Fervura e 57°C; 3- Fervura e 59°C; 4- Kit e 55°C; 5- Kit e 57°C; 6- Kit e 59°C

Foram também avaliadas diferentes concentrações de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), na mistura reacional de m-PCR, sendo elas: 1,5mM, 2,5mM, 5mM e 7,5 mM. Na figura seguinte, 3.2.2, é possível verificar que as bandas correspondentes às concentrações de 1,5mMol e de 2,5mMol apresentam poucas diferenças, sendo visíveis as bandas correspondentes a *Vibrio harveyi* (606 pb) e *Vibrio anguillarum* (469 pb). Nas concentrações de 5mM e 7,5 mM aparecem três bandas nítidas que correspondem às três diferentes espécies de *Vibrio* em estudo, indicando que a concentração de 7,5 mM de  $MgCl_2$  é a mais adequada.

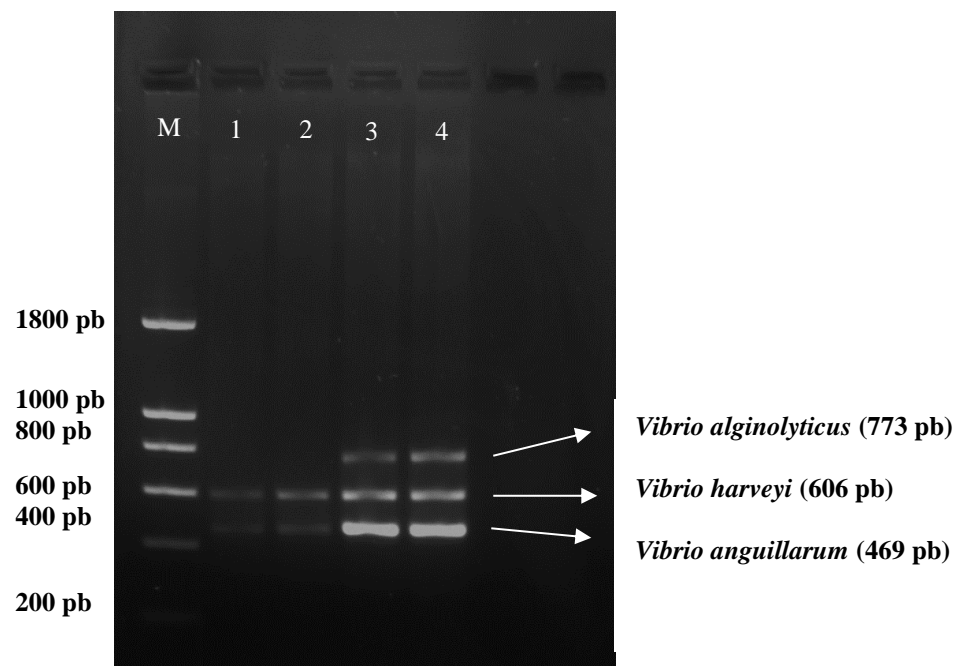


Figura 3.2.2 - m-PCR com diferentes concentrações de  $MgCl_2$ . M- Marcador de 200 pb; 1- 1,5mM; 2-2,5mM; 3- 5mM; 4 – 7,5mM

### 3.3. Sensibilidade da ferramenta de Multiplex-PCR

Para testar a sensibilidade da ferramenta de m-PCR, foram efetuadas diluições decimais sucessivas de uma amostra de ADN extraído pelo NZY Tissue gDNA isolation kit (100 ng/ $\mu$ l, 10 ng/ $\mu$ l, 1 ng/ $\mu$ l, 0,1 ng/ $\mu$ l, 0,01 ng/ $\mu$ l e 0,001 ng/ $\mu$ l). Os resultados estão expressos na figura 3.3.1, sendo visível um gradiente de intensidade de bandas, que se pode correlacionar com a concentração de ADN presente. De notar que este m-PCR foi realizado com a temperatura de *annealing* de 58°C e 7,5 mM de  $MgCl_2$ .

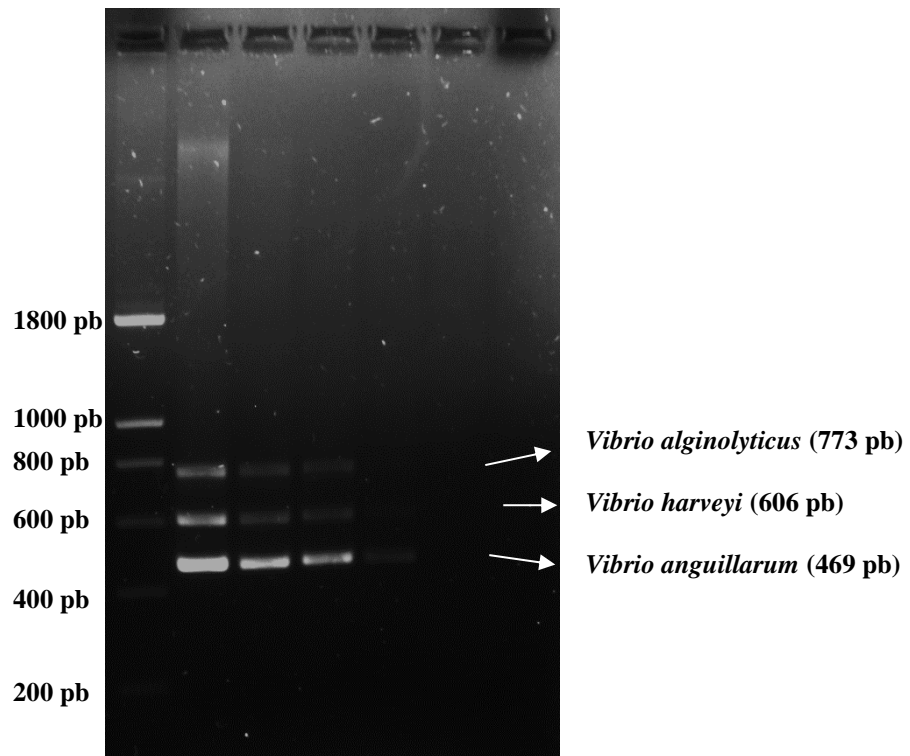


Figura 3.3.1 - Sensibilidade de m-PCR com diluições decimais sucessivas. M- Marcador de 200 pb; 1- 100 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias; 2- 10 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias; 3- 1 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias; 4- 0,1 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias; 5- 0,01 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias; 6- 0,001 ng/μl de ADN de cada uma das bactérias.

### 3.4. Multiplex-PCR em tecidos

De seguida, efetuou-se um teste de funcionamento da ferramenta de m-PCR em tecidos. Para tal, inocularam-se as três bactérias em estudo em três diferentes tecidos de linguado (fígado, baço e rim) e em plasma. Os tecidos foram obtidos em linguado, morto com sobredosagem de anestésico. As bactérias em estudo foram separadamente recolhidas por centrifugação e adicionadas aos tecidos/plasma. Como controlo negativo, também foi extraído o ADN a partir dos tecidos e do plasma utilizados.

Na figura 3.4.1, é possível visualizar, como seria de esperar, que os controlos negativos não apresentam nenhuma banda, como tal é possível afirmar que os *Vibrios* em estudo não estão presentes nas amostras de tecido utilizadas. Sabe-se que estes *Vibrios*, se encontram em altas concentrações na pele, sangue, fígado e tecidos hematopoiéticos, tais como, rim e baço (Balebona *et al.*, 1998; Frans *et al.*, 2011; Amar *et al.*, 2017) de peixes infetados. A figura 3.4.1, corrobora esta afirmação, pois, nos poços identificados como 1, 2, 3 e 4, correspondentes respetivamente ao fígado, baço, rim e plasma, é possível observar 3 bandas, que dizem respeito ao *Vibrio alginolyticus* (773 pb), *Vibrio harveyi* (606 pb) e *Vibrio anguillarum* (469 pb).

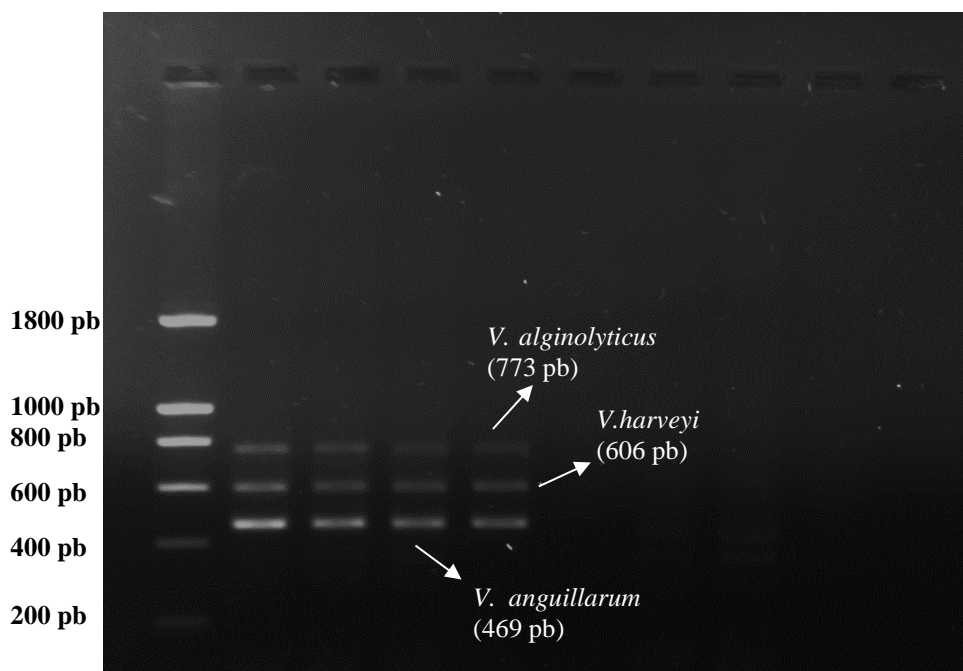


Figura 3.4.1 - Spiking no fígado, baço, rim e plasma de linguado saudável. M- Marcador de 200 pb. 1- Fígado inoculado com *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 2- Baço inoculado com *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 3 – Rim inoculado com *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 4- Plasma inoculado com *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 5- Controlo negativo de fígado; 6- Controlo negativo de baço; 7 – Controlo negativo de rim; 8- Controlo negativo de plasma

### 3.5. Sensibilidade do multiplex-PCR em tecidos

De forma a avaliar a sensibilidade desta ferramenta molecular é possível detetar pelas figuras 3.5.1 e 3.5.2 que a sensibilidade da ferramenta no caso particular de *Vibrio anguillarum* (469 pb) é razoável, havendo deteção do patógeno até à concentração de  $10^5$  UFCmL<sup>-1</sup>, no caso do plasma. A bactéria *Vibrio alginolyticus* (773 pb), embora com bandas menos nítidas que o *Vibrio anguillarum*, também pode ser encontrada até à concentração de  $10^5$  UFCmL<sup>-1</sup>, considerando-se que a ferramenta apresenta sensibilidade para detetar estes dois *Vibrios*. O *Vibrio harveyi* (606 pb) é o que apresenta uma menor sensibilidade, apresentando apenas banda na concentração de  $10^8$  UFCmL<sup>-1</sup>.

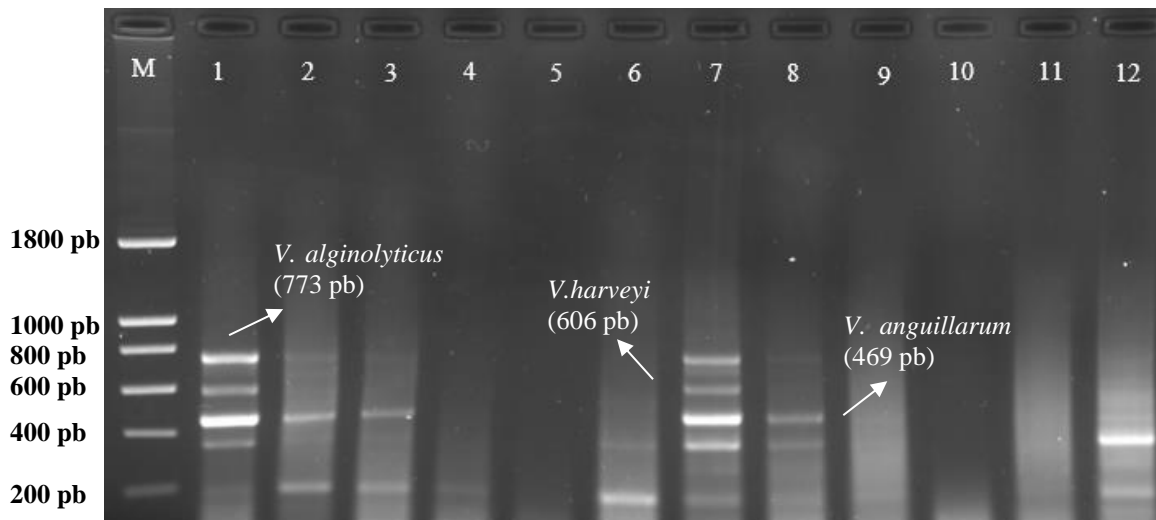


Figura 3.5.1 – Sensibilidade do m-PCR em fígado e baço. M- Marcador de 200pb. 1- Fígado com  $10^8$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 2- Fígado com  $10^7$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 3- Fígado com  $10^6$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 4 - Fígado com  $10^5$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 5- Fígado com  $10^4$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 6- Controlo negativo de fígado; 7- Baço com  $10^8$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 8 - Baço com  $10^7$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 9- Baço com  $10^6$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 10 - Baço com  $10^5$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 11 - Baço com  $10^4$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 12 - Controlo negativo de baço

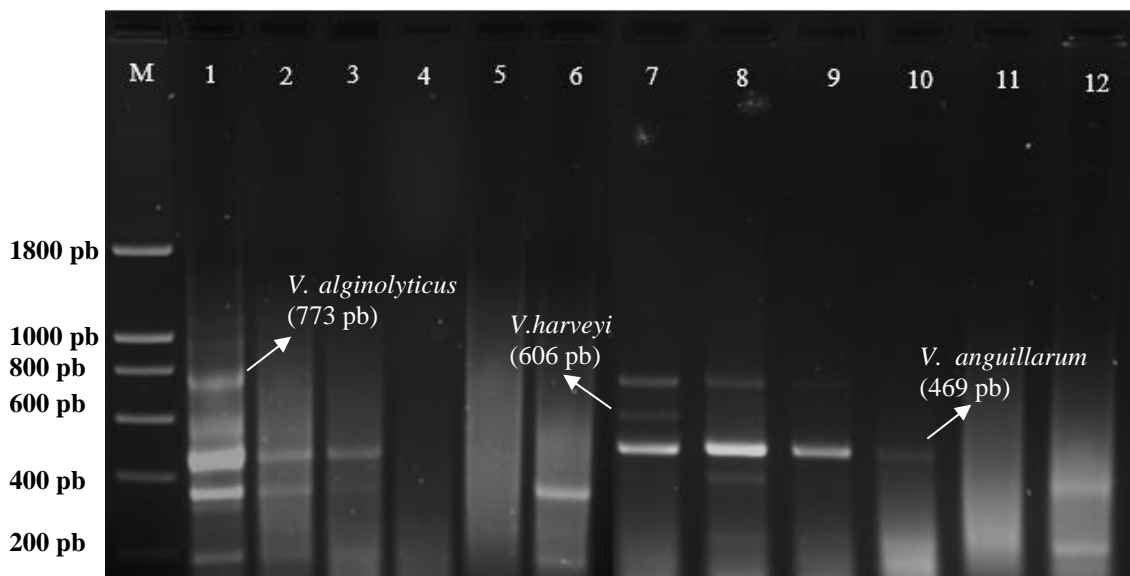


Figura 3.5.2 – Sensibilidade do m-PCR em rim e plasma. M- Marcador de 200pb. 1- Rim com  $10^8$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 2- Rim com  $10^7$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 3- Rim com  $10^6$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 4 - Rim com  $10^5$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 5- Rim com  $10^4$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 6- Controlo negativo de rim; 7- Plasma com  $10^8$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 8 - Plasma com  $10^7$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 9- Plasma com  $10^6$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 10 - Plasma com  $10^5$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 11 - Plasma com  $10^4$  UFCmL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*, *V.anguillarum* e *V.harveyi*; 12 - Controlo negativo de plasma

### 3.6. Validação da ferramenta

Para proceder à validação da ferramenta em condições reais de utilização, foram efetuadas reações de m-PCR, cujos resultados se encontram na figura 3.6.1, que engloba amostras de 3 tecidos (fígado, baço e rim) de linguados que morreram no decorrer do ensaio, e que indicam a presença de *V. alginolyticus* (773 pb) no fígado dos organismos 1 e 2 e no rim do organismo 1. Nas amostras de baço estudadas é detetada a presença de uma banda muito intensa, com tamanho de aproximadamente 180 pb, que não corresponde ao agente patogénico em estudo, sendo considerada uma banda inespecífica.

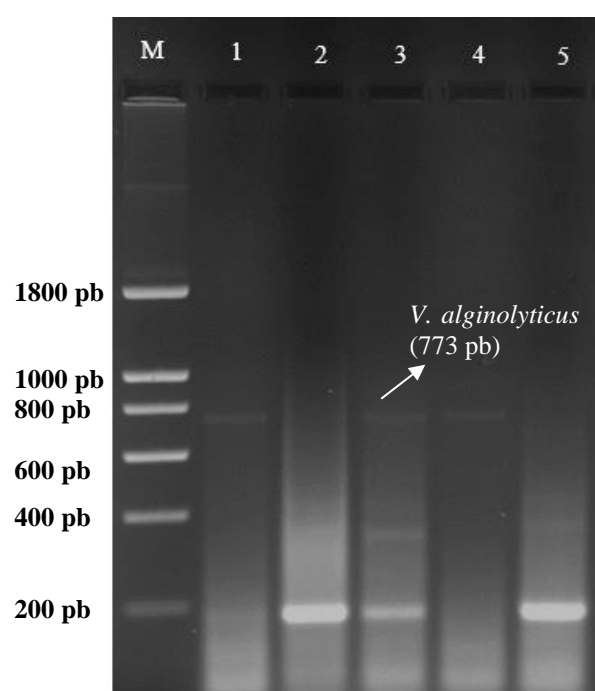


Figura 3.6.1. – Validação da ferramenta molecular em ADN extraído de tecidos (fígado, baço e rim) de 2 indivíduos que morreram durante a infeção. M- Marcador de 200 pb. 1- Fígado do indivíduo 1; 2- Baço do indivíduo 1; 3 – Rim do individuo 1; 4 – Fígado do individuo 2; 5 – Baço do individuo 2.

A figura 3.6.2. diz respeito à presença da bactéria (*V. alginolyticus*) em placas de TSA + 1% NaCl obtidas de riscado feito a partir de amostras dos tecidos em estudo (fígado, baço e rim). Podemos através da figura 3.6.2, afirmar que efetivamente se trata da bactéria *V. alginolyticus* (773 pb).

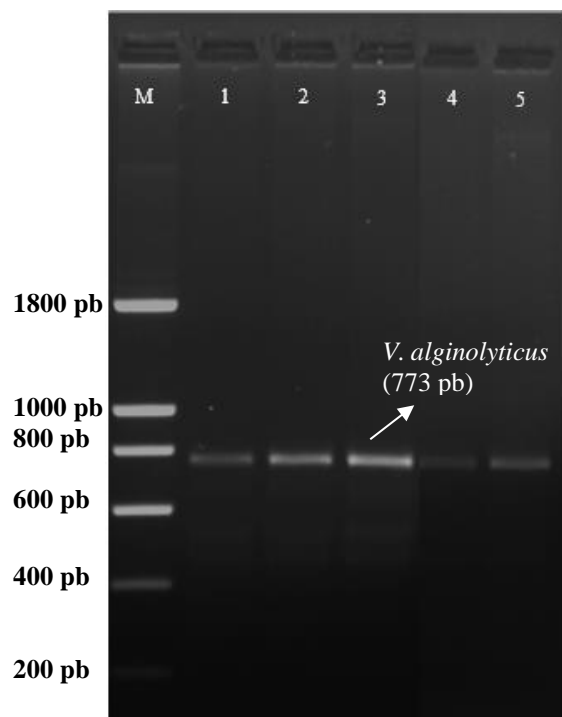


Figura 3.6.2. – Confirmação da presença da bactéria *V. alginolyticus*, em tecidos (fígado, baço e rim) de 2 indivíduos que morreram durante a infecção, extraída através de riscado feito em placas de TSA+ 1% NaCl. M- Marcador de 200 pb. 1- *V. alginolyticus* extraído do fígado do indivíduo 1; 2- *V. alginolyticus* extraído do baço do indivíduo 1; 3 – *V. alginolyticus* extraído do rim do indivíduo 1; 4 – *V. alginolyticus* extraído do fígado do indivíduo 2; 5 – *V. alginolyticus* extraído do baço do indivíduo 2.

## **4. Discussão**



Mundialmente, os ecossistemas marinhos estão entre os sistemas naturais mais valiosos e largamente utilizados, devido a proteção da linha de costa, atividades turísticas, filtração da água do mar, criação de áreas *nursery* e fornecimento de alimento através da pesca e aquacultura, nomeadamente aquaculturas intensivas e semi-intensivas (Polsenaere *et al.*, 2017). Atualmente o sector aquícola é citado devido ao seu rápido crescimento, com uma taxa de crescimento de aproximadamente 8% por ano, ano desde 1970 (Polsenaere *et al.*, 2017). Contudo, as aquaculturas comerciais também sofrem elevadas perdas financeiras devido a doenças causadas por determinados agentes patogénicos como bactérias, nomeadamente do género *Vibrio*, que têm a capacidade de se disseminar de forma muito rápida (Choudhury *et al.*, 2017).

A vibriose é a doença causada pelas bactérias da família *Vibrionaceae*, sendo uma das doenças em aquacultura reconhecida como das mais antigas e mais importantes (Gonzalez *et al.*, 2003). Para fazer face a esta situação é importante cada vez mais combater precocemente este tipo de doenças de forma a prevenir os surtos em aquaculturas, para tal, deverá de existir um maior cuidado e prevenção nas aquaculturas. Devido à utilização inadequada de antibióticos e o seu uso prolongado causa resistência em inúmeras espécies de patógenos, sendo que muitos desses agentes patogénicos que anteriormente eram suscetíveis aos antibióticos, hoje em dia, apresentam resistência (Loureiro *et al.*, 2016), fazendo assim com que estes antibióticos deixem de ser eficazes e devido a isso é tão importante ter cuidado com o surgimento destes agentes patogénicos em aquaculturas.

Com o intuito de contribuir para a prevenção da morbilidade e mortalidade em aquacultura, foi desenvolvida ao longo deste estudo, uma ferramenta molecular, o multiplex-PCR para identificar de forma rápida e específica três espécies diferentes de *Vibrio*, sendo estas o *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* e *Vibrio harveyi*. Esta ferramenta representa uma mais-valia a nível económico para as empresas do sector aquícola, uma vez que prematuramente poderá antever a presença de três bactérias extremamente mortíferas e assim prevenir um surto que dizime todos os peixes de uma aquacultura. Neste estudo, esta ferramenta de m-PCR irá ser validada em tecidos de peixes infetados, permitindo confirmar a sua eficácia e funcionalidade em peixes infetados provenientes de aquacultura.

Relativamente à especificidade dos primers utilizados, os resultados indicaram que estes são específicos para as bactérias em estudo e apresentam um limite de deteção muito satisfatório, o que vem reforçar os resultados já obtidos por outros autores (Ransangan & Lal, 2013; Pinto *et al.*, 2017), indicando que no caso do *Vibrio alginolyticus* a elevada especificidade do gene alvo específico da collagenase e no caso do *Vibrio harveyi* a especificidade do gene

específico da hemolisina. Para o *Vibrio anguillarum* o par de primers vah1 que foram desenhados utilizando a ferramenta Primer-Blast disponível pela NCBI, desenvolvidos neste estudo, também apresentam elevada especificidade com o gene específico de hemolisina.

A otimização dos m-PCR apresenta dificuldades que têm de ser ajustadas para que seja possível obter um melhor resultado e mais fiável. Algumas dessas dificuldades são a baixa sensibilidade e especificidade da técnica e amplificação preferencial de alvos que não são os pretendidos (Markoulatos et al., 2002), para além disto apresenta uma sensibilidade menor que o PCR simples, devido à potencial competição por reagentes, particularmente se as técnicas diferirem na sua eficiência de amplificação ou se um ou mais organismos alvo estiverem presentes em maior quantidade (Tapia-Cammas *et al.*, 2011). Existem vários parâmetros-chave do qual a amplificação específica e sensível das sequências de genes alvo dos m-PCR dependem, tais como: temperatura de *annealing*, concentração de primer, concentração de  $Mg^{2+}$ , tempo de extensão e quantidade e qualidade da Taq polimerase utilizada (Kong *et al.*, 2002). De acordo com isto, foi realizada ao longo deste estudo a otimização da ferramenta de m-PCR de forma a ter bandas alvo mais intensas e visíveis.

Inicialmente, compararam-se diferentes temperaturas de *annealing* (55°C, 57°C e 59°C), que como referido é um dos parâmetros-chave nesta técnica, tendo sido comparados dois métodos de extração de ADN (Fervura, um método mais económico vs NZY Tissue gDNA isolation kit, um método mais dispendioso). Indiscutivelmente o método de extração de ADN através do Kit é muito mais eficaz que o método de extração de ADN através do método de fervura. Em 2015, Timms e colaboradores, compararam diferentes métodos de extração de ADN a partir de tecidos de bovino, entre eles estavam o método de fervura e o método com utilização de kit, coincidindo com o kit utilizado neste estudo para a extração de ADN nos tecidos. Os autores pretendiam identificar uma bactéria e com a técnica de PCR verificaram que através da fervura, o ADN extraído não permitia a amplificação, estando por isso contaminado ou mesmo degradado. Embora se tratem de tecidos de animais muito díspares, as técnicas são as mesmas e os resultados são coincidentes, verificando assim que também neste caso o método mais económico não é o mais indicado. Embora seja um processo muito rápido e simples, não requer purificação adicional do ADN, ou seja o ADN não é totalmente dissociado da membrana e o rendimento apresentado é muito baixo, tal como a qualidade do ADN extraído, devido à presença de inibidores resistentes à fervura, tais como RNA, proteínas e restos de membrana (Jackson *et al.*, 1990).

Em relação à melhor temperatura de *annealing*, que é um dos parâmetros mais importantes (Kong *et al.*, 2002), na temperatura de 55°C as bandas estão mais nítidas, mas é

perceptível a presença de uma banda inespecífica com tamanho de aproximadamente 560 pb, sendo por isso necessário optar por temperaturas mais elevadas. Na temperatura de 59°C a banda referente ao *Vibrio alginolyticus* (773 pb) encontra-se um pouco menos nítida, e como tal optou-se por se usar a temperatura de 58°C nos próximos m-PCR realizados.

Foram igualmente comparadas diferentes concentrações de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) nas misturas reacionais, uma vez que a otimização deste componente é muito importante para a reação de m-PCR. Este parâmetro é fundamental pois a excessiva concentração de  $Mg^{2+}$  diminui a especificidade, já que pode estabilizar o *annealing* dos primers em sítios incorretos, mas por outro lado a baixa concentração de  $Mg^{2+}$ , reduz a quantidade de produto da reação e conseqüentemente o sucesso da mesma (Markoulatos *et al.*, 2002). A concentração de  $MgCl_2$  que apresenta melhores resultados é a concentração de 7,5 mM de  $MgCl_2$ .

Em 2002, Markoulatos e colaboradores indicaram claramente que antes da aplicação de um m-PCR este deve de ser avaliado quanto à sua sensibilidade e especificidade e comparado com PCR's simples. No que diz respeito à sensibilidade da ferramenta, m-PCR, na detecção das três bactérias em estudo, verifica-se um gradiente de intensidade de bandas, que se pode correlacionar com a concentração de ADN presente, sendo que na concentração de 0,1 ng/ $\mu$ l já só a banda correspondente ao *Vibrio anguillarum* (469 pb) é que se encontra nítida, sendo por isso o *Vibrio* que apresenta maior sensibilidade. Estes resultados vão de encontro com o descrito por Pinto *et al.* (2017), que desenvolveu um m-PCR no qual estavam integrados estes *Vibrios* e que no teste de sensibilidade relativo ao *V. harveyi* apresentou sensibilidade idêntica. Já a sensibilidade relativa a *V. anguillarum* e devido à utilização de primers distintos apresentou-se no presente estudo consideravelmente mais elevada à obtida por Pinto *et al.* (2017). Por outro lado, Ransangan e Lal em 2013, também utilizaram os mesmos primers para *V. harveyi* e *V. alginolyticus*, e verificaram igualmente um gradiente de intensidade de bandas, sendo que o m-PCR amplificou eficientemente até à concentração de 0,01 ng/ $\mu$ l.

Na presença de resultados positivos, avançou-se para o estudo com a utilização de tecidos, ou seja, a inoculação das bactérias nos tecidos e plasma retirados de linguados saudáveis. Este passo é extremamente importante, porque esta ferramenta poderá permitir a detecção de agentes patogénicos, que para além de ser essencial para fazer o controlo de doenças é fundamental na seleção de peixes reprodutores, pois peixes aparentemente saudáveis, sem sinais clínicos ou lesões visíveis podem ser portadores de agentes patogénicos. Isto poderá criar sérios riscos para a disseminação de doenças contagiosas nas populações de peixes, pois a doença apenas se torna evidente quando surgem condições stressantes, como as que ocorrem

em condições de aquacultura intensiva (Atinok, 2011; Kulkarni *et al.*, 2011). Como já foi referido, tratam-se de linguados sem a presença de nenhum destes *Vibrios* em estudo, uma vez que em nenhum dos controlos negativos se encontram bandas. Nas amostras contendo as bactérias adicionadas aos diferentes tecidos e plasma e através desta ferramenta molecular é possível fazer a sua deteção. Contudo, é necessário aumentar a sensibilidade da ferramenta, sendo que em *Vibrio anguillarum* e em *Vibrio alginolyticus* a sensibilidade vai até à concentração de  $10^5$  UFCml<sup>-1</sup>, sendo o *Vibrio harveyi* o que apresenta menor sensibilidade.

A sensibilidade limitada da ferramenta de m-PCR na deteção destes *Vibrios* é um problema já identificado em estudos anteriores, uma vez que neste caso encontra-se presente o ADN das bactérias juntamente com o ADN dos tecidos, sendo conhecido o facto do nível de deteção em tecidos de peixes e amostras de plasma é muito reduzido comparativamente a culturas bacterianas puras. Este facto foi também registado em 2003 por Gonzalez e colaboradores, que afirmam que as causas desta interferência podem ser devidas à presença de ADN do hospedeiro e inibidores indefinidos da reação de PCR (Wilson, 1997; Avendaño-Herrera *et al.*, 2004). Possivelmente devido a este facto, poucos autores testam a sensibilidade da ferramenta de m-PCR em tecidos, uma vez que já esperam observar uma sensibilidade muito baixa. Por outro lado, a excessiva sensibilidade dos PCR's muitas vezes pode ser um aspeto negativo, uma vez que foram relatados resultados falso-positivos devidos a contaminação cruzada. Outro problema é a inibição da reação, que pode ser total ou parcial e que se pode manifestar como uma falha completa da reação ou de sensibilidade de reação reduzida (Wilson, 1997).

Finalmente a ferramenta desenvolvida foi validada, através de peixes previamente infetados com um dos *Vibrios* em estudo, o *V. alginolyticus*. Através dos resultados presentes na figura 3.6.2, provenientes da cultura em placas do riscado feito a partir de amostras dos tecidos em estudo (fígado, baço e rim) é possível confirmar a infeção pela bactéria (*V. alginolyticus*) e conseqüentemente a sua presença em todos os tecidos estudados.

Nos tecidos recolhidos de dois linguados que morreram durante a infeção, apenas se deteta pelo m-PCR a presença de *V. alginolyticus* no fígado dos dois peixes e no rim do peixe 1. Nos baços de ambos os peixes é detetada a presença de uma banda intensa, com tamanho de aproximadamente 180 pb, que também está presente, embora menos nitidamente no rim do peixe 1, que não corresponde ao tamanho de amplificação do *Vibrio alginolyticus*. As explicações para esta ocorrência podem ser devido ao facto de o baço não apresentar a presença desta bactéria, que poderá ser devido a ser um órgão que apenas é afetado quando a concentração de bactéria é muito elevada ou então poderá estar relacionado com o sistema

imunitário dos peixes, uma vez que se tratavam de linguados adultos, estes possivelmente apresentaram capacidade de lutar contra a doença e diminuir o número de células invasoras e assim estas não tiveram a capacidade de invadir o baço. Para além disto e como já foi referido existem nos tecidos elevadas quantidades de ADN hospedeiro e inibidores indefinidos da reação de PCR que reduzem a nitidez do resultado obtido (Wilson, 1997).

O baixo nível de deteção das bandas de *V. alginolyticus* poderá dever-se aos factos acima explicados, contudo poderá ser minimizada através da otimização das condições da reação e garantindo que quantidades adequadas de todos os reagentes estejam disponíveis na mistura de reação. Um dos fatores a ter em conta, pode ser a quantidade de  $Mg^{2+}$ , uma vez que como referido anteriormente a excessiva concentração de  $Mg^{2+}$  diminui a especificidade, estabilizando o *annealing* dos primers em sítios incorretos, originando bandas inespecíficas (Markoulatos *et al.*, 2002).

Esta técnica de m-PCR constitui uma ferramenta muito interessante para a identificação precisa de diferentes espécies de *Vibrio* através de culturas bacterianas em placa bem como a partir de tecidos de peixes. Os métodos convencionais baseados na cultura de microrganismos permitem uma identificação precisa das espécies bacterianas alvo, contudo requerem mais tempo do que estes métodos moleculares, os quais são independentes de culturas (Liu *et al.*, 2016). Para além disso a deteção de bactérias utilizando métodos microbiológicos clássicos pode ser difícil em peixes assintomáticos, quando se tratam de níveis baixos de agentes patogénicos (Altinok, 2011). Geralmente, os m-PCR's são considerados menos sensíveis que os PCR's devido à competição por reagentes de reação, principalmente quando existem diferenças na eficiência de amplificação dos alvos ou quando existe maior quantidade de ADN em algum dos alvos (Tapia-Cammas *et al.*, 2011), contudo pode-se especular através da sensibilidade obtida no estudo que em infeções agudas será possível detetar através do m-PCR cada um dos patógenos em estudo.

Esta ferramenta molecular é uma mais-valia, nomeadamente em aquaculturas, principalmente quando se suspeita que hajam múltiplas infeções derivadas de diferentes agentes patogénicos, ou simplesmente para despistar a possibilidade da presença desses patógenos nas aquaculturas. O multiplex-PCR oferece um diagnóstico rápido e confiável e se existir efetivamente a presença de infeção, consegue-se implementar medidas de forma a prevenir a propagação da doença e conseqüentemente o extermínio da infeção. Para além disso, esta ferramenta é acessível economicamente e qualquer indivíduo com conhecimentos mínimos de biologia molecular está apta a utilizar este multiplex-PCR. No entanto, é cada vez mais importante investir em ferramentas moleculares que consigam detetar o maior número de

agentes patogénicos, com o menor tempo possível e com a menor utilização de recursos possível, este tipo de m-PCR constitui um passo nesse sentido.

## **5. Conclusões e Perspetivas Futuras**



Como conclusão, os melhores resultados obtidos no desenvolvimento desta ferramenta molecular para a detecção de *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* e *V. harveyi* em peixes, indicam que as reações de multiplex-PCR devem de ser feitas com a utilização de 35 ciclos na amplificação, sendo que a temperatura de *annealing* utilizada ideal é de 58°C e a concentração de MgCl<sub>2</sub> de 7,5 mM. A extração de ADN tem de ser efetuada com kits apropriados, pois o método de fervura testado não permitiu obter ADN de qualidade satisfatória. Com estas condições e os primers indicados, os resultados obtidos com este m-PCR são bastante satisfatórios, de elevada fiabilidade e com sensibilidade a um nível aceitável.

A disponibilidade deste tipo de método de diagnóstico, rápido, sensível e específico para a detecção de patógenos bacterianos que causam doenças é muito importante na aquacultura. Esta técnica permite a identificação precoce, rápida, precisa e confiável de mais do que um agente patogénico ao mesmo tempo beneficiando assim as aquaculturas que usufruírem desta ferramenta, uma vez que através desta informação conseguem prevenir um surto, que podem dizimar populações.

Para perspetivas futuras será adequada a validação da ferramenta em aquaculturas bem como, a realização da técnica não só em tecidos, mas sobretudo em sangue, como técnica não invasiva para a obtenção de amostras sendo assim mais adequado para a monitorização em aquaculturas.



## **6. Referências bibliográficas**



- Abdel-Aziz M., Eissa A.E., Hanna M., Okada M.A. (2013) Identifying some pathogenic *Vibrio*/Photobacterium species during mass mortalities of cultured Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) from some Egyptian coastal provinces. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 1: 87–95
- Altinok I. (2011) Multiplex PCR assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout disease. *Diseases of aquatic organisms* 93: 199-206
- Altinok I., Capkin E., Kayis S. (2008) Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. *Veterinary Microbiology* 131: 332–338
- Álvarez C.A., Acosta F., Montero D., Guzmán F., Torres E., Vega B., Mercado B. (2016) Synthetic hepcidin from fish: Uptake and protection against *Vibrio anguillarum* in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) *Fish & Shellfish Immunology* 55: 662-670
- Alves J., Hirooka E.Y., Oliveira T.C.R.M (2016) Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of *Campylobacter spp.* and *Salmonella spp.* in chicken meat. *LWT - Food Science and Technology* 72: 175- 181
- Amar E. C., Faisan J. P., Apines-Amar M. J. S., Pakingking R. V. (2017) Temporal changes in innate immunity parameters, epinecidin gene expression, and mortality in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* experimentally infected with a fish pathogen, *Vibrio harveyi* JML1. *Fish & Shellfish Immunology* 69: 153-163
- Austin B. (2010) Review: Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology* 140: 310–3177
- Avci H., Lu S. B., Cagirgan H. (2012) Pathological and immunohistochemical investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Revue De Medecine Veterinaire* 163: 31-39
- Avendaño-Herrera R., Magariños B., Toranzo A.E., Beaz R., Romalde J.L. (2004). Species-specific polymerase chain reaction primers sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 62: 75-83
- Balebona M. C., Andreu M. J., Bordas M. A., Zorrilla I., Morinigo M. A., Borrego J. J. (1998) Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4269-4275
- Balta F. (2016) Phenotypic, serotypic and genetic characterization and antimicrobial susceptibility determination of *Vibrio anguillarum*, isolated from cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) in the southeast black sea, turkey. *Fresenius Environmental Bulletin* 10: 4393-4400
- Canak, O. 2011. Determination of the protein profiles of some pathogenic bacteria isolated from cultured Gilthead sea bream (*Sparus aurata*, l. 1758). Msc. Thesis: İstanbul: İstanbul University
- Choudhury T. G., Nagaraju V. T., Gita S., Paria A., Parhi J. (2017) Advances in Bacteriophage Research for Bacterial Disease Control in Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 25: 113-125

- Crisafi F., Denaro R., Genovese M., Cappello S., Mancuso M., Genovese L. (2011) Comparison of *16SrDNA* and *toxR* genes as targets for detection of *Vibrio anguillarum* in *Dicentrarchus labrax* kidney and liver. *Research in Microbiology* 162: 223–230
- Damir K., Irena V.S, Damir V., Emin T. (2013) Occurrence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Vibrio alginolyticus* in the Eastern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 75: 46–52
- Dash P., Avunje S., Tandel R. S., Sandeep K. P., Panigrahi A. (2017) Biocontrol of Luminous Vibriosis in Shrimp Aquaculture: A Review of Current Approaches and Future Perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 25: 245-255
- Dashtiannasb A. & Yeganeh V. (2017) The effect of ethanol extract of a macroalgae *Laurencia snyderia* on growth parameters and vibriosis resistance in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 16: 210-221
- FAO (2016) The State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries & Aquaculture Department. Rome
- Frans, I., Michiels C. W., Bossier P., Willems K. A., Lievens B., Rediers H. (2011) *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases* 34: 643-661
- Garibyan L. & Avashia N. (2013) Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR) *J Invest Dermatol.* 133: 1-8
- Ghittino C., Latini M., Agnetti F., Panzieri C., Lauro L., Ciappelloni R., Petracca G. (2003) Emerging pathologies in aquaculture: Effects on production and food safety. *Veterinary Research Communications* 27: 471-479
- Gonzalez, S. F., Osorio C. R., Santos Y. (2003) Development of a PCR-based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples. *Diseases of Aquatic Organisms* 55: 109-115
- Haldar S., Maharajan A., Chatterjee S., Hunter S.A., Chowdhury N., Hinenoya A., Asakura M., Yamasaki S. (2010) Identification of *Vibrio harveyi* as a causative bacterium for a tail rot disease of sea bream *Sparus aurata* from research hatchery in Malta. *Microbiological Research* 165: 639—648
- Hickey M.E., Richards G.P., Lee J-L. (2015) Development of a two-step, non-probed multiplex real-time PCR for surveilling *Vibrio anguillarum* in seawater. *Journal of Fish Diseases* 38: 551–559
- Hong G. E., Kim D. G., Bae J. Y., Ahn S. H., Bai S. C., Kong I. S. (2007) Species-specific PCR detection of the fish pathogen, *Vibrio anguillarum*, using the *amiB* gene, which encodes N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *Fems Microbiology Letters* 269: 201-206
- Jackson D. P., Lewis F. A., Taylor G. R., Boylston A. W., Quirke P. (1990) Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 43: 499-504

- Kim J.Y. & Lee J-L (2014) Multipurpose assessment for the quantification of *Vibrio* spp. and total bacteria in fish and seawater using multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Sci Food Agric* 94: 2807–2817
- Kong R. Y. C., Lee S. K. Y., Law T. W. F., Law S. H. W. , Wu R. S. S. (2002) Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Research* 36: 2802-2812
- Kulkarni A., Caipang, C. M. A., Korsnes K., Brinchmann M. F., Kiron V. (2011). Molecular diagnosis of francisellosis, a systemic granulomatous inflammatory disease in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Vet. Res. Commun.*35: 67-77
- Kwok A. Y.C., Wilson J.T, Coulthart M., Ng L-K, Mutharia L., Chow A.C. (2002) Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial hsp60 gene sequences. *Can. J. Microbiol.* 48: 903–910
- Lal T. M., Sano M., Ransangan J. (2017) Isolation and Characterization of Large Marine Bacteriophage (Myoviridae), VhKM4 Infecting *Vibrio harveyi*. *Journal of Aquatic Animal Health* 29: 26-30
- Liu L., Ge M., Zheng X., Tao Z., Zhou S., Wang G. (2016) Investigation of *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, and *V. parahaemolyticus* in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson) reared in Xiangshan Bay, China. *Aquaculture Reports* 3: 220 – 224
- Loureiro J.R., Roque F., Rodrigues A.T., Herdeiro M.T., Ramalheira E. (2016) O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de Saúde Pública* 34: 77-84
- Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M. (2002) Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 16: 47–51
- Medina A., Mancera J.M., Martínez-Manzanares E., Moriñigo M.A., Arijo S. (2015) Identification of *Vibrio harveyi* proteins involved in the specific immune response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Fish & Shellfish Immunology* 47: 377 – 380
- Mosca F., Ciulli S., Volpatti D., Romano N., Volpe E., Bulfon C., Massimini M., Caccia E., Galeotti M., Tiscar P.G. (2014) Defensive response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against *Listonella anguillarum* or *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* experimental infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 162: 83–95
- Mustapha S., Mustapha E. M., Nozha C. (2013) *Vibrio alginolyticus*: An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases. *International Journal of Science and Technology* 4: 302-309
- Nhung P.H., Ohkusu K., Miyasaka J., Sun X.S., Ezaki T. (2007) Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to dnaJ gene. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59: 271–275

- Pinto M.P., Baptista T., Afonso C.C.A. (2017) Development of a new multiplex-PCR for the simultaneous detection of the fish pathogens *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi* and *Edwardsiella tarda*. *Aquatic Living Resources* 30: 1-6
- Polsenaere P., Soletchnik P., Le Moine O., Gohin F., Robert S., Pepin J. F., Stanisiere J. Y., Dumas F., Bechemin C., Gouletquer P. (2017) Potential environmental drivers of a regional blue mussel mass mortality event (winter of 2014, Breton Sound, France). *Journal of Sea Research*, 123: 39-50
- Pujalte M.J., Sitjà-Bobadilla A., Macián M.C., Belloch C., Álvarez-Pellitero P., Pérez-Sánchez J., Uruburu F., Garay E. (2003) Virulence and Molecular Typing of *Vibrio harveyi* Strains Isolated from Cultured Dentex, Gilthead Sea Bream and European Sea Bass. *System. Appl. Microbiol.* 26: 284–292
- Roberts R.J. (2004a). 8: The bacteriology of teleosts. In R.J. Roberts (Ed.), *Fish pathology*. (3rd ed.). (pp. 297-331). U.K. & U.S.A.: W.B. Saunders, Elsevier Limited
- Ransangan J. and Lal M.M.T. (2013). Simultaneous detection of *Photobacterium damsela*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* using multiplex PCR amplification method. *International Research Journal of Biological Sciences* 12: 79-84
- Shi Y. H., Chen J., Li C. H., Lu X. J., Zhang D. M., Li H. Y., Zhao Z. X., Li M. Y. (2012) Detection of bacterial pathogens in aquaculture samples by DNA microarray analysis. *Aquaculture* 338: 29-35
- Sorroza L., Padilla D., Acosta F., Roman L., Grasso V., Veja J., Real F. (2012) Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Microbiology* 155: 369–373
- Tapia-Cammas D., Yañez A., Arancibia G., Toranzo A. E., Avendaño-Herrera R. (2011) Multiplex PCR for the detection of *Piscirickettsia salmonis*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Streptococcus phocae* in Chilean marine farms. *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 135–142
- Timms V. J., Mitchell H. M., Neilan B. A (2015) Optimisation of DNA extraction and validation of PCR assays to detect *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*, 112: 99-103
- Toranzo A.E., Magarinos B., Romalde J.L. (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246: 37– 61
- Vincent M., Tuah L., Wei C.C.S., Bilung L.M., Apun K. (2015) Application of the Multiplex Polymerase Chain Reaction (M-PCR) for the Screening of *Vibrio* spp. from Rivers in Kuching, Sarawak. *Borneo Journal of Resource Science and Technology* 5: 16-27
- Xu X. D., Liu K. F., Wang S. F., Guo W. L., Xie Z. Y., Zhou Y. C. (2017) Identification of pathogenicity, investigation of virulent gene distribution and development of a virulent strain-specific detection PCR method for *Vibrio harveyi* isolated from Hainan Province and Guangdong Province, China. *Aquaculture* 468: 226-234

- Weber B., Chen C., Milton D. L. (2010) Colonization of fish skin is vital for *Vibrio anguillarum* to cause disease. *Environmental Microbiology Reports* 2: 133-139
- Wei S., Zhao H., Xian Y., Hussain M.A., Wu X. (2014) Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 79: 115–118
- Wilson, I.G. (1997). Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3741-3751
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134
- Zhang D.F., Zhang Q.Q., Li A.H. (2014) Development of a multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of four genera of fish pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 59: 471-478



## **Anexos**



## Anexo 1:

Tabelas referentes aos valores de densidade ótica e UFC para o *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* e *Vibrio harveyi*

Tabela I - Valores de densidade ótica e UFC para o *Vibrio alginolyticus*. (Inc= incontável)

<i>Vibrio alginolyticus</i>		
Diluições	Absorvância	Média UFC
-1	0,359	Inc.
-2	0,046	Inc.
-3	0,003	Inc.
-4	0	Inc.
-5	0	60,5
-6	0	5,5
-7	0	0,5
-8	0	0
-9	0	0

Tabela II- Valores de densidade ótica e UFC para o *Vibrio anguillarum*. (Inc= incontável)

<i>Vibrio anguillarum</i>		
Diluições	Absorvância	Média UFC
-1	0,338	Inc.
-2	0,045	Inc.
-3	0,005	Inc.
-4	0,003	Inc.
-5	0,002	Inc.
-6	0	Inc.
-7	0	55,5
-8	0	100
-9	0	1

Tabela III- Valores de densidade ótica e UFC para o *Vibrio harveyi*. (Inc= incontável)

<i>Vibrio harveyi</i>		
<b>Diluições</b>	Absorvância	Média UFC
<b>-1</b>	0,181	Inc.
<b>-2</b>	0,018	Inc.
<b>-3</b>	0,002	Inc.
<b>-4</b>	0	Inc.
<b>-5</b>	0,001	96,5
<b>-6</b>	0	1,5
<b>-7</b>	0	0,5
<b>-8</b>	0	0,5
<b>-9</b>	0	0