

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

**Marco António Macieira Ferreira**

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

**Marco António Macieira Ferreira**

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

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Professora Doutora Clélia  
Afonso e coorientação da Professora Especialista Teresa Baptista

2021

Copyright © Marco António Macieira Ferreira

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 este trabalho de projeto 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**

Agradeço a todos os que me acompanharam neste caminho.

Começando pela minha família que apesar de todas as complicações que têm existido nas nossas vidas sempre lá estiveram presentes e prontos a ajudar dentro do possível.

Gostava também de dar um enorme agradecimento às minhas orientadoras, a professora Teresa Baptista e especialmente à professora Clélia Afonso que foi incansável comigo e esteve sempre lá para me ajudar neste longo percurso.

À Ana Correia, ao Mário Cavaco e ao Marco Simões pelas ajudas todas que me deram seja por dificuldades no trabalho ou logística (guardar os tubinhos!!).

Obrigado a todos!



## **Resumo**

As estirpes patogénicas em estudo provocam doenças devastadoras em aquaculturas de peixes da família Salmonidae e Centropomidae (e.g. Salmão e Robalo, respetivamente). Em casos de surto, as taxas de mortalidade são extremamente elevadas e as consequências são devastadoras a nível económico, causando elevados prejuízos, visto existir uma enorme dificuldade em detetar as infeções a tempo. Com o aumento da importância e do valor económico da aquacultura tornou-se fulcral que as estirpes *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* e *Yersinia ruckeri* consigam ser detetadas a tempo de modo a evitar as respetivas doenças e evitar contaminações em massa.

Presentemente existem algumas ferramentas, como por exemplo, vacinas e antibióticos que possuem diferentes graus de eficácia para combater as doenças provocadas por estas estirpes, no entanto são escassas as ferramentas que detetem precocemente a presença de estirpes patogénicas, de modo a atuar de forma eficaz. As ferramentas PCR são cada vez mais utilizadas, com diversas finalidades, entre as quais a deteção de patógenos, um desenvolvimento essencial na prevenção, e assim, combate a estas doenças. Dentro das várias técnicas de PCR, o multiplex-PCR tem várias vantagens comparando com o PCR convencional, destacando-se a poupança de tempo e recursos, devido à possibilidade de deteção de várias estirpes numa única reação. A rapidez de deteção de uma ferramenta de multiplex-PCR juntamente com a sua simplicidade e baixo custo torna, uma possível ferramenta de multiplex-PCR, essencial para a deteção atempada das estirpes patogénicas prevenindo a infeção, visto que as estirpes podem ser detetadas antes que se tornem infecciosas, e o contágio para outros peixes nos tanques de aquacultura.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e testar uma ferramenta de multiplex-PCR, procurando uma forma rápida, económica e eficaz para a deteção precoce de peixes infetados com as estirpes referidas de modo a evitar a sua propagação em tanques de aquacultura.

Conseguiu-se em três das quatro estirpes uma deteção até 0,6 pg/μl e para a restante, *Vibrio harveyi*, 0,016 ng/μl. A ferramenta desenvolvida demonstra uma sensibilidade elevada, essencial para que possa ser implementada com sucesso, permitindo a deteção precoce destas bactérias patogénicas em peixes e potencialmente outros organismos.

Palavras-chave: *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Yersinia ruckeri*  
Doenças, aquacultura, Ferramenta de multiplex-PCR

## **Abstract**

The strains used in this work cause devastating diseases for aquaculture with fish from the Salmonidae and Centropomidae families (e.g., Salmon and Sea bass respectively). Firstly, due to the high mortality rates in the respective tank that is susceptible of contamination and consequently they are also devastating at an economic level, causing huge losses since the infections are not detected in time for contaminations to be avoided. With the increase in importance and economic value of aquaculture, it has become essential that strains such as *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* and *Yersinia ruckeri* are able to be detected in time to prevent the respective disease and refrain mass contamination.

There are already some tools, like, vaccines and antibiotics with different degrees of efficiency when countering the diseases that these strains cause. However, tools that prevent mass contamination by detecting the strains at an early stage, before they become infectious, are scarce. PCR tools are increasingly used for different ends and the detection of these pathogens could be an essential development in preventing, and therefore, combating these diseases. Amongst the several PCR techniques, multiplex-PCR has several advantages when compared to conventional PCR, with highlights on time and resource savings since it is possible to detect several strains with a single reaction. The reaction speed coupled with its simplicity and low cost makes a multiplex-PCR tool essential for an early detection of these pathogenic strains, since the strains can be detected before they become infectious, preventing the infection, and contamination to other fishes in aquaculture tanks.

The objective of this work was the development of a fast, economical, and effective multiplex-PCR tool for an early detection of fish infected with these strains to prevent their propagation in aquaculture tanks.

The tool was able to detect DNA concentrations down to 0.6 pg /  $\mu$ l in three of the four strains and for the other one, *Vibrio harveyi*, 0.016 ng /  $\mu$ l. Thus, demonstrating a very high sensitivity which will be essential in its implementation, allowing for an early diagnosis of these pathogenic strains in fish and potentially other organisms.

Keywords: *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Yersinia ruckeri*

Diseases, aquaculture, multiplex-PCR tool



# Índice de Conteúdos

Agradecimentos .....	V
Resumo .....	VII
Abstract .....	IX
Índice de Conteúdos .....	XI
Índice de Tabelas .....	XIII
Índice de Figuras .....	XV
Índice de Abreviaturas.....	XVII
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Aquacultura e Doenças Principais associadas .....	2
1.2. Principais patógenos em Aquacultura .....	4
1.3. Técnicas de deteção de Patógenos em Aquacultura .....	9
1.4. Objetivos .....	12
<b>2. Metodologia .....</b>	<b>13</b>
2.1. Estirpes utilizadas e condições de cultura .....	14
2.2. Desenho e utilização de oligonucleotídeos.....	14
2.3. Extração de ADN .....	15
2.4. Reações PCR, Multiplex PCR e Eletroforese.....	15
2.5. Validação da Ferramenta em tecidos de peixe .....	17
<b>3. Resultados.....</b>	<b>19</b>
3.1. Extrações de ADN.....	20
3.2. PCR com amplificação de <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Vibrio harveyi</i> e <i>Yersinia ruckeri</i> .....	21
3.3. Multiplex-PCR .....	22
3.4. Otimização das Condições para o Multiplex- PCR .....	23
3.5. Sensibilidade da Ferramenta de Multiplex-PCR .....	24
3.6. Validação da Ferramenta.....	25
<b>4. Discussão.....</b>	<b>27</b>
4.1. Extração de ADN .....	28
4.2. Desenvolvimento e Validação da Ferramenta .....	29
<b>5. Conclusões e Perspetivas Futuras.....</b>	<b>35</b>
<b>6. Referências.....</b>	<b>37</b>



## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 2-1</b> Oligonucleotídeos utilizados e respectivos genes e estirpes.....	14
<b>Tabela 2-2</b> Componentes presentes nas reações de multiplex-PCR.....	16
<b>Tabela 3-1</b> Extrações de ADN.....	20
<b>Tabela 3-2</b> Extrações utilizadas para a validação da estirpe. TI- Tempo de Infecção; T- Peso do Tecido; C- Concentração da Extração.....	25



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Fotografia de microscópio eletrônico de <i>Vibrio anguillarum</i> 775 (Frans <i>et al.</i> , 2011).....	5
<b>Figura 1.2.</b> Fotografia de microscópio eletrônico de <i>Vibrio alginolyticus</i> (Son, <i>et al.</i> , 2012)..	6
<b>Figura 1.3.</b> Fotografia de microscópio eletrônico de <i>Vibrio harveyi</i> (Tu, <i>et al.</i> , 2017) .....	7
<b>Figura 1.4.</b> <i>Yersinia ruckeri</i> . Microfotografia de microscópio eletrônico de transmissão (x25000) (Shaowu, <i>et al.</i> , 2013). .....	7
<b>Figura 1.5.</b> Truta-arco-íris com sintomas de ERD. A: escurecimento da pele, zona abdominal maior que o normal (seta preta), hemorragias na barbatana dorsal (seta branca). B: hemorragias dentro e em volta da boca. C: baço preto e expandido (seta branca), intestino avermelhado (seta preta) (Kumar <i>et al.</i> , 2015). .....	8
<b>Figura 1.6.</b> Demonstração de um Multiplex-PCR. (Adaptado de Premier Biosoft, 2021). .....	10
<b>Figura 2.1.</b> NZYADN ladder VIII (Nzytech genes & enzymes). .....	16
<b>Figura 3.1.</b> Gel da agarose com os resultados obtidos no PCR simples das quatro estirpes. M- Marcador (NZYADN ladder VIII (Nzytech genes & enzymes)), 1- <i>Vibrio anguillarum</i> (569bp), 2- <i>Vibrio alginolyticus</i> (206bp). 3- <i>Vibrio harveyi</i> (713bp) e 4- <i>Yersinia ruckeri</i> (956 bp).....	21
<b>Figura 3.2.</b> Gel da agarose com as bandas amplificadas por multiplex-PCR com as condições descritas Tabela 2 2. <i>Vibrio anguillarum</i> (569bp), <i>Vibrio alginolyticus</i> (206bp), <i>Vibrio harveyi</i> (713bp) e <i>Yersinia ruckeri</i> (956 bp). <i>Vibrio anguillarum</i> (569bp), <i>Vibrio alginolyticus</i> (206bp), <i>Vibrio harveyi</i> (713bp) e <i>Yersinia ruckeri</i> (956 bp). .....	22
<b>Figura 3.3.</b> Gel de agarose com os resultados do multiplex-PCR com diferentes concentrações de MgCl <sub>2</sub> (mM). <i>Vibrio anguillarum</i> (569bp), <i>Vibrio alginolyticus</i> (206bp). <i>Vibrio harveyi</i> (713bp) e <i>Yersinia ruckeri</i> (956 bp). .....	23
<b>Figura 3.4.</b> Gel de agarose com os resultados do multiplex-PCR em diferentes temperaturas de annealing (°C). <i>Vibrio anguillarum</i> (569bp), <i>Vibrio alginolyticus</i> (206bp). <i>Vibrio harveyi</i> (713bp) e <i>Yersinia ruckeri</i> (956 bp). .....	23
<b>Figura 3.5.</b> Gel de agarose com os resultados das reações de multiplex-PCR com diluições de ADN sucessivas (ng/μl). M- Marcador, C- Controlo negativo, Valores = concentração em ng/μl. <i>Vibrio anguillarum</i> (569bp), <i>Vibrio alginolyticus</i> (206bp), <i>Vibrio harveyi</i> (713bp) e <i>Yersinia ruckeri</i> (956 bp). .....	24
<b>Figura 3.6.</b> Resultados do m-PCR para efeitos de validação da ferramenta com ADN de diferentes órgãos e horas de infeção. 1- Controlo com ADN extraído de fígado; 2- Fígado de um robalo infetado, após 24h; 3- ADN de Fígado de peixe moribundo; 4- Controlo com ADN extraído do Rim, 5- Rim após 9h de infeção; 6- ADN de Rim de peixe Moribundo; 7- Mix ADN utilizada; 8- ADN de <i>Vibrio anguillarum</i> (569bp); 9- Controlo da reação de PCR. ....	25



## **Índice de Abreviaturas**

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

ERM - *Enteric Red mouth Disease*

DEBV – *Doença Entérica da Boca Vermelha*

ADN - *Ácido desoxirribonucleico*

TSB - *Trypticase Soy Broth*

TSA - *Trypticase Soy Agar*

FAO - *Food and Agriculture Organization*

TAE – *Tris-acetate-EDTA*



# **1. Introdução**

## 1.1. Aquacultura e Principais Doenças

A aquacultura é o processo de cultivo de organismos aquáticos, em tanques, *offshore* ou águas interiores (OECD, 2020). Esta possui um papel cada vez mais importante devido à crescente escassez de peixe nos oceanos, fenómeno que se deve à sobre-exploração dos *stocks* existentes. A aquacultura revela-se assim como uma das principais formas de produção de organismos aquáticos em todo o mundo (FAO, 2020; OECD,2020).

Cada vez a produção aquícola é feita de forma mais intensiva, procurando assim atingir volumes de produção mais elevados (Assefa & Abunna, 2018; Novriadi, 2016). Uma produção em regime intensivo, devido à elevada densidade de indivíduos, torna mais fácil a propagação de agentes patogénicos nos tanques de produção aquícola, sendo esta a principal causa de perdas no setor, as quais atingem os 6 mil milhões de dólares anualmente (Assefa, 2018).

Numa tentativa de contornar este problema, foram introduzidas algumas medidas, como por exemplo, a administração de antibióticos por via oral, em peixes. Os antibióticos têm por objetivo o tratamento e/ou prevenção de doenças, a aceleração do crescimento e o aumento da eficiência da utilização das rações, assim como a sincronização de ciclos reprodutivos (Menkem, *et al.*, 2019). No entanto, esta medida originou dois problemas, relacionados entre si. O primeiro, e principal, está relacionado com o facto que o uso prolongado destes compostos potencia o aparecimento de novas estirpes microbianas, resistentes a antibióticos, e o facto de os resíduos de antibióticos que permanecem nas partes comestíveis dos animais provocarem potenciais alergias e toxicidade nos consumidores. O surgimento de resistência da flora natural do trato gastrointestinal e de doenças cancerígenas, efeitos reprodutivos e até teratogenicidade, são possíveis problemas resultantes desta ingestão de resíduos de antibióticos (Menkem *et al.*, 2019). O segundo problema prende-se com restrições legais, relacionadas com a proibição ou restrição da utilização destes compostos em alguns países, o que poderá limitar o mercado de exportação dos organismos produzidos (Dubert *et al.*, 2016; Elmahdi *et al.*, 2016; Novriadi, 2016). Na Noruega, por exemplo, o limite de uso de antibiótico é de 1 g por tonelada métrica de produção, já no Vietname são 700 g por tonelada métrica de produção. Na União Europeia o uso de antibióticos não terapêuticos foi banido em 2006 (Towers, 2014; UE, 2006). Assim, surge a necessidade de implementar medidas alternativas de prevenção e tratamento de doenças de origem microbiana. Estas estratégias alternativas passam pela vacinação, imuno-

estimulação, uso de probióticos, e *Quorum sensing*. De entre estas alternativas, a vacinação continua a ser a mais viável e amplamente utilizada. Esta pode ser administrada de várias maneiras, como por via oral, sprays, imersão direta ou injeção. Este último é o método mais eficaz pois permite a administração da dose correta, no entanto apresenta desvantagens como o tempo da operação e dificuldade de o fazer em alguns peixes mais esguios e pequenos (Novriadi, 2016). Para além disso as vacinas para doenças virais e fúngicas, continuam pouco desenvolvidas ou são inexistentes, devido à dificuldade de produção (Shefat, 2018) A imunestimulação parece ser uma boa alternativa para compensar as limitações das vacinas, pois este método é eficiente e com maior abrangência, visto não ser específico para determinada doença, como é o caso das vacinas (Thangaraj, *et al.*, 2017). Para além disso, possui outras vantagens tais como custos reduzidos, não produz efeitos secundários ou resíduos tóxicos e não impacta de forma significativa o meio ambiente (Thangaraj, *et al.*, 2017). O uso de probióticos não é frequentemente rentável se estiverem continuamente a ser administrados para manter concentrações elevadas (Novriadi, 2016). No entanto, estes continuam a possuir algumas vantagens, nomeadamente a inibição competitiva (competição por locais de adesão), a produção de compostos inibitórios contra patógenos, a modulação do sistema imunitário do hóspede, a competição por compostos químicos, energia e nutrientes, a melhoria da qualidade da água e a interferência em fenómenos de *Quorum sensing* (Mohapatra, *et al.*, 2013). Em relação ao *Quorum sensing*, este já acontece naturalmente em bactérias e basicamente é uma forma de comunicação que permite a expressão ou restrição de genes dependendo da densidade populacional de bactérias numa determinada área. As bactérias tendem a expressar certos genes (e.g. genes de virulência) quando tal densidade é mais elevada (Zhao, *et al.*, 2019). Sendo assim, o objetivo deste método é inibir ou interromper este processo natural conseguindo assim combater infeções. Isto será especialmente útil em estirpes resistentes a antibióticos visto que este método visa a não utilização dos mesmos. No entanto esta metodologia ainda está muito pouco desenvolvida (Novriadi, 2016; Zhao, *et al.*, 2019).

Para além disso é conhecido que por vezes as bactérias, como as do género *Vibrio*, estão presentes nos animais, porém sem se tornarem virulentas. Isto ocorre devido ao facto de serem bactérias oportunistas, que só provocam doença quando o sistema imunitário dos organismos está deprimido por alguma razão (Cuéllar-Anjel, 2013). Em tanques de aquacultura intensiva, o nível de stress nos peixes é mais elevado que o normal e sendo assim, estes patógenos oportunistas aproveitam a fraqueza do sistema imunitário dos peixes e provocam a doença.

O stress pode ser provocado por vários fatores, que vão desde o pH, a temperatura da água, o fotoperíodo e a densidade de peixes presentes no tanque (Rehman, *et al.*, 2017). Pontualmente, o stress é benéfico para o organismo em questão (*Eustress*), porém, se presente durante períodos alargados de tempo, verificam-se efeitos negativos no crescimento e no sistema imunitário dos peixes, levando a uma maior suscetibilidade a infeções (Rehman *et al.*, 2017).

Num tanque é inevitável a existência de microrganismos sendo que em condições normais estes são inofensivos, no entanto, quando os peixes se encontram em stress alguns desses microrganismos tornam-se mais agressivos (denominam-se de patógenos facultativos, i.e., *Vibrios*) provocando assim infeção (Rehman *et al.*, 2017).

## 1.2. Principais patógenos em Aquacultura

Entre os diferentes patógenos possíveis de ocorrer em sistemas de aquacultura intensiva distinguem-se alguns mais frequentes, tais como os do género *Vibrio*. Estes são bactérias gram-negativas, com forma cilíndrica em virgula (vibrião) que são responsáveis pela vibriose. A vibriose é uma doença crónica devastadora, sendo a principal causa de mortalidade e de perdas económicas em aquacultura (Tan & Gram, 2014). Os primeiros e principais sintomas desta doença são a falta de apetite, descoloração da pele e uma tendência anormal para nadar perto da superfície (Ina-Salwany *et al.*, 2019). Neste estudo abordaram-se 3 espécies deste género: *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi*.

*Vibrio anguillarum* também conhecido como *Listonella anguillarum* (Figura 1.1.), é o principal causador da vibriose em animais marinhos tais como, peixes, bivalves e crustáceos. Os peixes doentes demonstram sintomas como hemorragias nas barbatanas, exoftalmia, e a opacidade das córneas. Nos bivalves, esta causa movimentos irregulares, tal como nos crustáceos, que para além desse sintoma, ainda possuem outros sintomas tais como perda de reflexo de fuga, anorexia, coloração avermelhada, perfurações do exoesqueleto, entre outras (Cuéllar-Anjel, 2013; Frans *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2018; Novriadi, 2016). Normalmente esta bactéria está apenas associada a infeções em animais, no entanto, já existe um caso documentado de uma morte humana provocada por uma infeção de *Vibrio anguillarum* o que demonstra a urgência em desenvolver um método rápido, fiável e relativamente barato de detetar estas bactérias em organismos de aquacultura (Sinatra & Colby, 2018).

Já existem alguns estudos utilizando métodos de PCR para a sua detecção em tecidos de peixe tal como o estudo de Pinto *et al.*, (2017) que utilizou o gene *rpoN*, o de Ferreira (2018) com a utilização do gene da hemolisina *vah1* e o de Izumi & Suzuki (2016), sendo que neste último utilizaram *primers* para amplificar o gene *gyrB*. O gene *gyrB* faz parte da subunidade B da ADN-girase que é essencial para a replicação do ADN e é utilizado muitas vezes como marcador filogenético em bactérias visto ser mais discriminatório para grupos bacterianos semelhantes, do que as sequências do 16S rRNA (Bunpa, *et al.*, 2018). Estes estudos foram bem-sucedidos na detecção de *Vibrio anguillarum* com PCR e com multiplex-PCR (m-PCR) em tecidos e órgãos de peixe. No presente estudo também se utilizou o gene *gyrB* para a maioria das espécies em estudo.



Figura 1.1. Fotografia de microscópio eletrônico de *Vibrio anguillarum* 775 (Frans *et al.*, 2011).

Em relação a *Vibrio alginolyticus* (Figura 1.2.), este começou por ser classificado como biótipo 2 de *V. parahaemolyticus*, sendo mais tarde diferenciado (Mustapha *et al.*, 2014). Estas duas espécies possuem diferenças bioquímicas, nomeadamente a nível da capacidade de fermentação de sacarose que está presente em *V. alginolyticus* mas ausente em *V. parahaemolyticus* (Mustapha *et al.*, 2014). *Vibrio alginolyticus* vive livremente em sedimentos e água, sendo uma das espécies do género *Vibrio* mais abundantes no meio natural, ou seja, independentes de hospedeiros. Possui uma enorme capacidade de resistência a condições de stress e mesmo nessas condições consegue manter a sua capacidade de virulência (Fu *et al.*, 2016; Mustapha *et al.*, 2014). Esta espécie é patogénica para o ser humano e animais, podendo provocar otites, infeções oculares e infeções intestinais, e até pode levar à morte (Fu *et al.*, 2016; Le Roux *et al.*, 2015).

Mustapha *et al.*, (2014) sugere também o uso de técnicas de PCR para a detecção de estirpes de *V. alginolyticus* que contenham genes de virulência como *thermostable direct hemolysin* (*tdh*) e *thermostable related hemolysin* (*trh*).

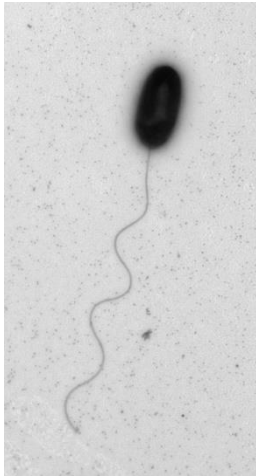


Figura 1.2. Fotografia de microscópio eletrônico de *Vibrio alginolyticus* (Son, *et al.*, 2012).

*Vibrio harveyi* (Figura 1.3.) é uma bactéria gram-negativa luminescente e é uma das espécies fundamentais do gênero *Vibrio*, segundo a análise da sequência de rRNA 16S (B Austin & Zhang, 2006). Esta espécie é considerada patógena para animais marinhos mas não patógena em humanos apesar de já existirem quatro casos documentados de infecção em humanos (Giglia-aguirre, 2017). Para além disso no estudo de Montánchez, *et al.*, (2019) verificou-se que quando em condições idênticas às da superfície do oceano 90% das células perdiam a sua capacidade de ser cultivadas e ficavam parcialmente danificadas após duas semanas. No entanto, nestas mesmas condições, a expressão de genes de virulência (i.e., enzimas líticas, componentes do sistema de secreção T3SS e compostos que promovem a quelação de ferro) foi promovida, o que significa que em condições adversas esta estirpe vai tornar-se mais virulenta para escapar tais condições tentando assim entrar num hospedeiro e provocar doença. O que demonstra o seu potencial emergente com o aquecimento global, visto que com o aquecimento global e assim o aumento da temperatura dos oceanos, esta estirpe tem potencial para se tornar mais agressiva e mais infecciosa.

Por norma, em peixes, os sintomas típicos de uma infecção por *Vibrio harveyi* são as gastroenterites, lesões oculares e vasculites (B Austin & Zhang, 2006). Sendo que provoca mortalidades elevadas também em crustáceos, especialmente em camarão (Austin & Zhang, 2006; Montánchez *et al.*, 2019). Visto que normalmente se encontra livre em águas tropicais, esta espécie tem uma tendência para se disseminar com o aquecimento global devido ao aumento da temperatura da água do mar e com isso o aumento de doenças associadas a *Vibrio* spp (B Austin & Zhang, 2006; Montánchez *et al.*, 2019).

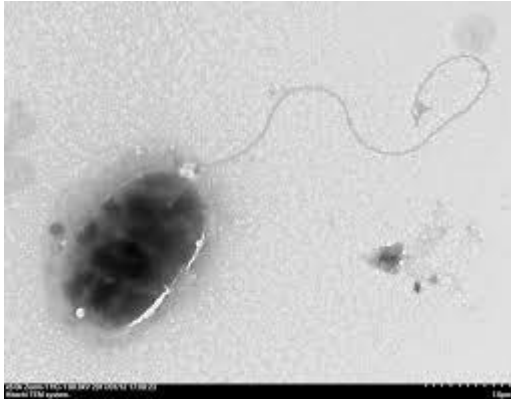


Figura 1.3. Fotografia de microscópio eletrônico de *Vibrio harveyi* (Tu, *et al.*, 2017)

Para além destes Vibrios, foi também estudada *Yersinia ruckeri* (Figura 1.4.). Esta é também uma bactéria gram-negativa da família Enterobacteriaceae com forma de bastonete que habita em águas temperadas (Barnes *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2015; Menanteau-Ledouble *et al.*, 2018). Esta foi detetada pela primeira vez em truta-arco-íris nos Estados Unidos da América (EUA), encontrando-se agora espalhada um pouco por todo o mundo (Kumar *et al.*, 2015). Esta bactéria é o agente patogénico causador da *Enteric Redmouth Disease* (ERM) em português Doença Entérica da Boca Vermelha (DEBV) (Figura 1.5.), uma doença que tem como principais sintomas o escurecimento da cor do peixe, perda de apetite, inflamação do intestino com acumulação de líquido amarelo, letargia, regiões do corpo avermelhadas incluindo a boca

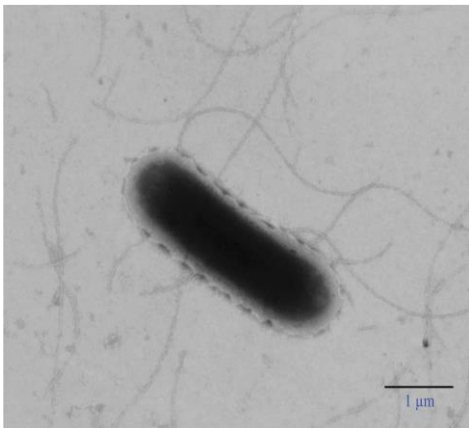


Figura 1.4. *Yersinia ruckeri*. Microfotografia de microscópio eletrônico de transmissão (x25000) (Shaowu, *et al.*, 2013).

devido a hemorragias subcutâneas e por vezes exoftalmia (Kumar *et al.*, 2015; Wrobel *et al.*, 2019).

Esta doença afeta tanto peixes de água doce como de água salgada, mas principalmente afeta membros da família Salmonidae (Wrobel *et al.*, 2019). Apesar disso já foi reportada a sua presença numa ferida humana, queijo, frango, leite e carne moída (Guijarro *et al.*, 2018).

Atualmente existem vacinas eficazes contra o serotipo O1 biótipo 1 que é o principal causador da doença, no entanto, estas ainda não demonstram uma elevada eficácia contra o biótipo 2, o qual continua a causar surtos da doença mesmo em peixes vacinados (Wrobel *et al.*, 2019). Para além disto, o recente aparecimento de novos serotipos resistentes às vacinas tem levado a uma marcada redução na eficácia destas vacinas. A estes fatores juntam-se ainda as perdas económicas causadas pela doença em aquacultura, promovendo esta bactéria a um grau de importância cada vez maior nas variadas áreas de pesquisa (Kumar *et al.*, 2015; Wrobel *et al.*, 2019).

Apesar de tudo a taxa de mortalidade dos peixes é baixa nas fase iniciais, só posteriormente aumenta rapidamente (Wrobel *et al.*, 2019), o que significa que uma ferramenta com a capacidade de detetar a bactéria antecipadamente seria o ideal para evitar que esta se espalhe e provoque infeções que levam a prejuízos avultados.



Figura 1.5. Truta-arco-íris com sintomas de DEBV. A: escurecimento da pele, zona abdominal maior que o normal (seta preta), hemorragias na barbatana dorsal (seta branca). B: hemorragias dentro e em volta da boca. C: baço preto e expandido (seta branca), intestino avermelhado (seta preta) (Kumar *et al.*, 2015).

### 1.3. Técnicas de Detecção de Patógenos em Aquacultura

A deteção de doenças infecciosas em peixes é mais complicada do que em animais terrestres devido à própria natureza destes animais, sendo mais difícil a sua observação e captura, visto que normalmente se juntam em cardumes (Assefa & Abunna, 2018).

Para além disso, em sistemas de aquacultura intensiva, os peixes estão presentes em densidades elevadas, partilhando o mesmo espaço, e ficando assim mais suscetíveis a contrair e disseminar diversos tipos de doenças. Para controlar esta situação é necessário recolher amostras, não só dos próprios peixes, mas também de água, para analisar características como o pH, turbidez, temperatura e salinidade, e também as condições do solo no fundo do tanque, para evitar que os peixes estejam em stress e as doenças se propagem facilmente como já foi referido anteriormente (Assefa & Abunna, 2018).

Existem três principais tipos de técnicas para a deteção de patógenos em peixes: os métodos de microbiologia clássica (que envolvem crescimento microbiano em meios de cultivo), serologia e técnicas moleculares. Os métodos de microbiologia clássica são mais morosos e estão também dependentes da observação de sintomas num dos animais que possa sugerir algum desenvolvimento de uma patologia (Austin, 2019). A identificação do patógeno é também mais difícil de se realizar apenas por observação das placas por isso, por norma, recorre-se a técnicas de serologia ou técnicas moleculares para efeito de validação (Austin, 2019). Em relação ao método serológico, este método inclui várias técnicas que têm como principais vantagens, a mais fácil e mais precisa identificação dos patógenos com a utilização, por exemplo, de fluorescência, de aglomeração das células ou delimitação de células com tinta (Austin, 2019). A técnica mais conhecida de todas é o ensaio de imuno-absorção enzimática (ELISA), este abriu portas a testes no local em tecidos infetados, mas no entanto estas técnicas serológicas não conseguem ser tão sensíveis como as técnicas moleculares e por isso testes com utilização de PCR e hibridização *in situ* são os mais utilizados e adequados (Adams & Thompson, 2011; Austin, 2019).

Os métodos de moleculares continuam em crescimento de popularidade em relação aos outros mencionados visto que estes métodos tendem a ser mais rápidos, mais específicos, precisos e sem necessidade de cultivo de células (Mishra, *et al.*, 2019).

Dentro dos métodos de PCR existem várias técnicas sendo que a utilizada neste estudo foi o multiplex-PCR (m-PCR).

O multiplex-PCR é uma variante do PCR clássico, onde várias sequências podem ser amplificadas simultaneamente, utilizando os oligonucleotídeos adequados, com temperaturas de *annealing* semelhantes e sem complementaridade, para evitar dimerizações e, também, para que o resultado de cada amplificação tenha tamanhos diferentes, para cada gene alvo (Mishra *et al.*, 2019) (Figura 1.6.). Já foi aplicada a diferentes áreas desde a sua introdução, como na análise de polimorfismos, análises quantitativas de ADN, análises de deleção de genes, detecção de RNA, análises a mutações e estudos forenses (Elnifro, *et al.*, 2000; Premier Biosoft, 2021; Mishra *et al.*, 2019). Para além disto na área de doenças infecciosas também demonstra ser um método valioso para a identificação de vírus, bactéria, fungos e/ou parasitas (Elnifro *et al.*, 2000; Hajia, 2017).

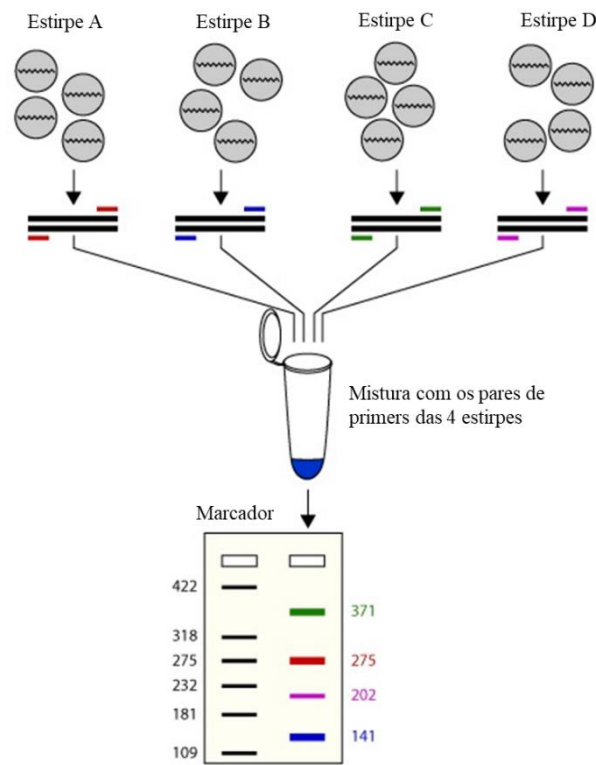


Figura 1.6. Demonstração de um Multiplex-PCR. (Adaptado de Premier Biosoft, 2021).

O multiplex-PCR possui diversas vantagens, destacando-se a redução de tempo e de custos, sem comprometer a fiabilidade dos resultados (Altinok, *et al.*, 2008; Edwards & Gibbs, 1994; Mishra *et al.*, 2019). A rapidez e versatilidade deste método pode ser demonstrada por vários estudos já realizados como no de Huang *et al.*, (2018) com a rápida detecção de vírus que provocam infeções respiratórias, ou o de Tsuji *et al.*, (2018) para a detecção de duas espécies de *Japanese Medaka* (*Oryzias latipes* e *O. sakaizumii*) utilizando ADN ambiental.

Este método também possui limitações, tais como os próprios oligonucleotídeos ligarem-se entre si (os chamados *primer dimers*), fraca sensibilidade ou especificidade e/ou a amplificação preferencial para certos genes e a incapacidade de distinguir entre ADN de microrganismos vivos e mortos (Elnifro *et al.*, 2000; Espiñeira, *et al.*, 2010; Markoulatos, *et al.*, 2002). Para combater alguns destes problemas é necessário otimizar as condições do multiplex PCR, com ajustes nos seus componentes tais como, as concentrações de *Taq* ADN polimerase e/ou cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) e a temperatura de *annealing* (Elnifro *et al.*, 2000). Para além disso, por vezes, aditivos como glicerol, sulfóxido de dimetilo, albumina de soro bovino, ou betaína, são benéficos para as reações de multiplex PCR ao prevenir a inibição da polimerização do ADN, inibindo a formação de estruturas secundárias no ADN durante o processo de extensão (Elnifro *et al.*, 2000).

O método de m-PCR já foi utilizado diversas vezes em peixes para a deteção simultânea de vários patógenos. Por exemplo, Kim *et al.*, (2019) desenvolveram uma ferramenta de multiplex PCR para a deteção de várias espécies de *Vibrio* nas quais se incluem *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi*. Nesse estudo utilizando os chamados *house keeping genes*, ou seja, os genes de manutenção, foram bem-sucedidos na deteção das espécies estudadas inclusive em tecido de fígado de sargo (*Pagrus major*) infetado artificialmente, apesar de concluírem que ainda é necessária uma maior e melhor validação da ferramenta. Também no estudo de Ferreira (2018) foram obtidos resultados para estas três espécies em tecidos de linguado (*Solea senegalensis*) como o rim, o baço e o fígado, sendo que a ferramenta foi apenas validada para *V. alginolyticus*. Não deixa, no entanto, de ser uma ferramenta inovadora, mas que deixa em aberto o desenvolvimento de novas variantes, como este estudo pretende.

Para além desse estudo, também o de Messelhäusser *et al.*, (2010) foi bem-sucedido no desenvolvimento e validação de três ferramentas de multiplex PCR para a deteção de espécies do género *Vibrio* em amostras de tecidos de escamudo-do-Alasca (*Gadus chalcogrammus*). No estudo de Chapela *et al.*, (2018), foi desenvolvida uma ferramenta de multiplex PCR quantitativo em que se testou a possível deteção de *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae* e *Flavobacterium psychrophilum*. Utilizando oligonucleotídeos específicos, foram bem-sucedidos com a ferramenta de multiplex PCR em tecidos de truta (*Oncorhynchus mykiss*), nomeadamente baço e cérebro.

Altinok, *et al.*, (2008) desenhou uma ferramenta de m-PCR para a detecção de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum*, e *Yersinia ruckeri* em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). A ferramenta não desenvolveu nenhuma amplificação não-específica, e demonstrou boa especificidade. O mesmo se aplica ao estudo de Cerro, *et al.*, (2002) que foi o primeiro a desenvolver uma ferramenta de m-PCR para a detecção de patógenos de peixes, nomeadamente *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, e *Yersinia ruckeri* também em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Apesar de já existirem alguns estudos com um objetivo semelhante, como os referidos acima, o presente estudo pretende desenvolver uma ferramenta que junte alguns dos principais e mais comuns patógenos de aquacultura numa só ferramenta e ao mesmo tempo que esta possua uma sensibilidade ainda maior que os previamente desenvolvidos no âmbito de conseguir ser mais fiável e aplicável para casos práticos de peixes de aquacultura, visto que, as amostras retiradas de peixes contêm sempre inúmeros ADNs diferentes e em quantidades muito reduzidas que podem possuir alguma homologia.

#### **1.4. Objetivos**

Desenvolver e validar uma ferramenta de multiplex PCR sensível que permita a detecção rápida e eficaz de *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, e *Yersinia ruckeri* em tecidos de peixes.

## **2. Metodologia**

## 2.1. Estirpes utilizadas e condições de cultura

Neste estudo foram utilizadas três estirpes do gênero *Vibrio*: *Vibrio anguillarum* (AQV55.1), *Vibrio alginolyticus* (CECT 521) e *Vibrio harveyi* (VH-017/18V5).

As estirpes de *V. anguillarum* e *V. alginolyticus* foram colocadas em crescimento em meio líquido TSB (*Trypticase Soy Broth*, VWR) suplementado com 1% NaCl (PanReac AppliChem). O crescimento fez-se a 28°C durante 24h com agitação de 130rpm (Stuart SI500). Após 24h de crescimento, as culturas foram transferidas para meio TCBS (*Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar*, VWR) para confirmação.

O mesmo procedimento foi realizado para *Yersinia ruckeri* (QSP 57.1), tendo a confirmação sido realizada em meio TSA (*Trypticase Soy Agar*, VWR).

## 2.2. Desenho e utilização de oligonucleotídeos

Todos os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando a ferramenta *Primer-Blast* disponível pela NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Tabela 2-1 Oligonucleotídeos utilizados e respectivos genes e estirpes

Espécie	Gene ( <i>accession number</i> )	Oligonucleotídeos (5'>3')	Tamanho	Temperatura de hibridação (°C)
<i>Vibrio anguillarum</i> (AQV 55.1)	NC_015633.1:c 215633-213216 (gyrB)	Ang2F: 3'-AGCATTAGCAGGTGAAGCGT-5' Ang2R: 3'-GCATACGGCGAGATTCAGGA-5'	569	60.04/59.97
<i>Vibrio alginolyticus</i> (CECT521)	EU680781.1 (gyrB)	Alg4F: 3'-CATCGTCGCCTGAAGTCGC-5' Alg4R: 3'-TGAAGACGGCATTTCAGTTG-5'	206	60.04/60.04
<i>Vibrio harveyi</i> (VH-017/18 V5)	NZ_BAOD0100 0015.1:18959- 21376 (gyrB)	Har2F: 3'-TAGCTTCTCTAGCGCTTCGC-5' Har2R: 3'-AGTCAGCGGTTGAATCAGCA-5'	713	59.97/59.96
<i>Yersinia ruckeri</i> (QSP 57.1)	KJ606914.1 (16S)	Yer3F: 3'-CAGCGGAAAGTAGCTTGCTA-5' Yer3R: 3'-CACCAAGGCATCTCTGCCAA-5'	956	61.51/58.08

### 2.3. Extração de ADN

A extração do ADN das estirpes bacterianas realizou-se por fervura. Começou-se por colocar 1 ml de cultura (com 24h de crescimento) em microtubos de 2 ml. Após uma centrifugação a 11 200 g (Eppendorf, 5415R), o sobrenadante foi descartado, recolhendo-se o *pellet*. Este foi ressuspensionado em 100 µl de água milli-Q estéril e aquecido numa placa de aquecimento a 100 °C (VWR, Digital Heatblock) durante 10 minutos. De seguida centrifugou-se a 19 515 g durante 2 minutos à temperatura ambiente e recolheu-se o sobrenadante, onde se encontra o ADN. Por fim foi aferido o grau de pureza das amostras de ADN, através do espectrofotómetro UV-Vis para micro-volumes (Thermo Scientific, Nanodrop 2000). O ADN foi guardado em microtubos a -20°C.

### 2.4. Reações PCR, Multiplex PCR e Eletroforese

As reações de PCR foram realizadas com 12,5 µl de NZYTaQ 2 × Green Master Mix 0,2 U/µl (NZYTech), 2 µM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de mistura da solução de trabalho de cada par de *primers*, 5,5 µl de água estéril Milli-Q e 1µl de ADN (0,5 µg/µl) num volume final de 25 µl. As reações de PCR (Bio-rad T100) fizeram-se com um passo inicial de desnaturação a 95°C durante 4 minutos, sendo depois realizados 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 62°C durante 45 segundos e extensão durante 1 minuto a 72°C. Por fim, o último passo de extensão decorreu a 72 °C durante 10 min.

As reações de multiplex-PCR (m1) foram realizadas com 12,5 µl Multiplex PCR NZYTaQ 2× Green Master Mix (0,2 U/ µL), 1 µM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de mistura da solução de trabalho de cada par de *primers*, 6,5 µl de água estéril Milli-Q e 1 µl de ADN (0,5 µg/µl) num volume final de 25 µl com 64 °C como temperatura de *annealing*.

Foram realizados vários multiplex-PCRs, para avaliar diferentes condições como é possível verificar na Tabela 2-2.

Tabela 2-2 Componentes presentes nas reações de multiplex-PCR.

Condições	Multiplex	m1	m2	m3	m4
Multiplex PCR NZYTaQ 2× Green Master Mix (0,2 U/μL)		12,5 μl	12,5 μl	12,5 μl	12,5 μl
MgCl <sub>2</sub>		1μM	1μM	1μM	1μM
Mistura da solução de trabalho de cada par de <i>primers</i>		0,4μM	0,4μM (Remistura nova para <i>Vibrio anguillarum</i> )	0,5 μM de <i>primer</i> de <i>Vibrio harveyi</i> e 0,3μM de <i>primer</i> de <i>Vibrio anguillarum</i> 0,4μM para as restantes	0,4μM
Água estéril Milli-Q		6,5μl	6,5μl	6,5μl	6,5μl
ADN		0,5 μg/μl	0,5 μg/μl	0,5 μg/μl	0,75 μg/μl de <i>V. harveyi</i>

De seguida realizaram-se otimizações às condições do multiplex-PCR em relação à temperatura de annealing e concentração de MgCl<sub>2</sub> sendo que as melhores condições continuaram a ser as utilizadas inicialmente e descritas anteriormente, ou seja, 1μM de MgCl<sub>2</sub> e 64 °C de temperatura de annealing.

Os resultados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (1%, w/v), com tampão TAE 1x corado com *Greensafe* (Nzytech genes & enzymes). O marcador utilizado foi o NZYADN *ladder* VIII (Nzytech genes & enzymes) (Figura 2.1). A eletroforese decorreu durante 1h a 80 Volts. Por fim o resultado foi observado através de um transiluminador UV – Gel Doc (Bio-rad).

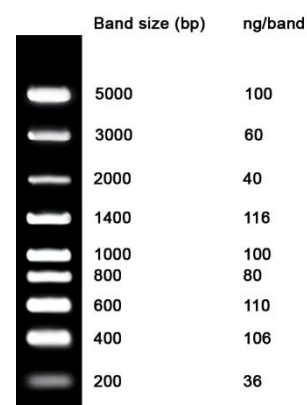


Figura 2.1. NZYADN *ladder* VIII (Nzytech genes & enzymes).

## 2.5. Validação da Ferramenta em tecidos de peixe

A validação da ferramenta foi realizada para *V. anguillarum* através da extração de amostras de fígado e rim, de Robalo (*Dicentrarchus labrax*) às 0h, 9h, 24h e moribundos (7 dias) após infecção, sendo esta uma infecção experimental. As extrações foram realizadas utilizando o kit de extração *DNeasy blood and tissue* (QIAGEN) e seguindo o protocolo *Purification of total ADN from Animal Tissues (Spin-Column protocol)* (QIAGEN, 2006) utilizando 30 µl água Milli-Q para eluir o ADN.

As condições Multiplex-PCR utilizadas nos tecidos foram as mencionadas acima, utilizando a Multiplex PCR NZYTaQ 2× Green Master Mix (0,2 U/µL), num volume final de 25µl, com 64 °C como temperatura de *annealing*.



### **3. Resultados**

### 3.1. Extrações de ADN

Das extrações de ADN, obtiveram-se os resultados apresentados na Tabela 3-1.

Tabela 3-1 Extrações de ADN

Estirpes	Concentração (ng/μl)	Ratio 260/280	Ratio 260/230
<i>Vibrio anguillarum</i> (AQV 55.1)	428,3	1,74	0,74
<i>Vibrio alginolyticus</i> (CECT521)	1390,5	1,91	1,16
<i>Vibrio harveyi</i> (VH-017/18 V5)	396,7	1,80	0,91
<i>Yersinia ruckeri</i> (QSP 57.1)	1177,2	2,02	1,50

Como é possível observar na Tabela 3-1, foi em *Vibrio alginolyticus* que se obteve uma concentração mais elevada de ADN, e em *Vibrio harveyi* a menor concentração de ADN. Em relação ao ratio Abs 260/280, os valores desejáveis deveriam rondar 1,8. Esse valor foi registado apenas para *Vibrio harveyi*, mas, no entanto, apenas em *Yersinia ruckeri* se verificou um valor elevado de 2,02. Por fim em relação ao ratio 260/230, em todas as estirpes este valor foi menor que os do ratio 260/280 sendo que para um melhor grau de purificação deveriam ser semelhantes ou superiores.

### 3.2. PCR para amplificação de *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi* e *Yersinia ruckeri*

Para testar a especificidade dos oligonucleotídeos para as respectivas estirpes foi realizado um PCR simples, com as quatro estirpes, em tubos independentes (Figura 3.1). Como é possível observar *V. alginolyticus* possui uma banda mais ténue enquanto as outras três estirpes possuem bandas mais intensas, revelando por isso que *V. alginolyticus* tem menor afinidade com os seus respectivos oligonucleotídeos ou que existem contaminantes na amostra de ADN utilizada, que podem interferir na reação.

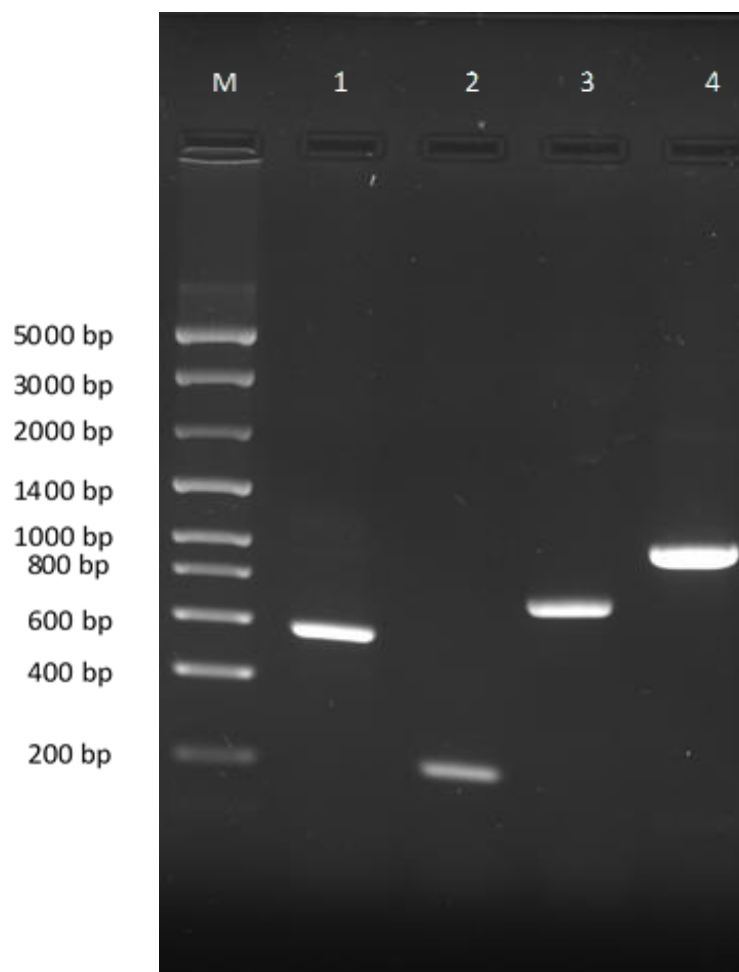


Figura 3.1. Gel da agarose com os resultados obtidos no PCR simples das quatro estirpes. M- Marcador (NZYADN ladder VIII (Nzytech genes & enzymes)), 1- *Vibrio anguillarum* (569bp), 2- *Vibrio alginolyticus* (206bp). 3- *Vibrio harveyi* (713bp) e 4- *Yersinia ruckeri* (956 bp)

### 3.3. Multiplex-PCR

Os resultados relativos às reações de multiplex-PCR (m-PCR), permitiram aferir a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados, na presença simultânea de ADN das diversas espécies em estudo (Figura 3.2)

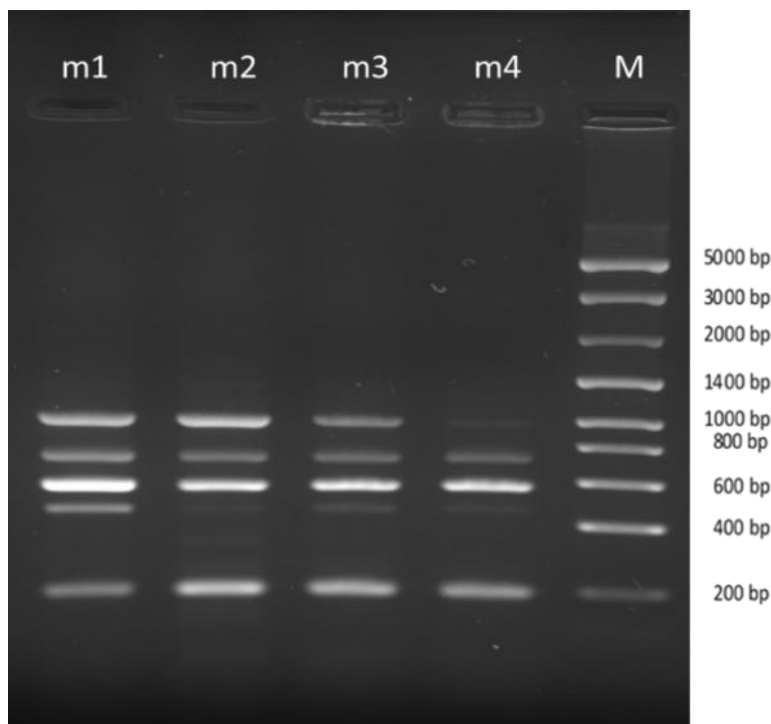


Figura 3.2. Gel da agarose com as bandas amplificadas por multiplex-PCR com as condições descritas Tabela 2-2. *Vibrio anguillarum* (569bp), *Vibrio alginolyticus* (206bp), *Vibrio harveyi* (713bp) e *Yersinia ruckeri* (956 bp).

Na figura 3.2 encontram-se as bandas obtidas através da realização de quatro multiplex PCRs, de acordo com a tabela 2-2, para testar várias hipóteses. Verificou-se que m2 foi o melhor resultado obtido, ficando com as quatro bandas das respetivas estirpes bem definidas. Sendo que m2 é uma repetição quase exata de m1, apenas com uma remistura dos *primers* de *V. anguillarum*, isto sugere que a mistura de *primers* utilizada em m1 estaria contaminada e assim interferia com o resultado final. Seguiu-se então para as otimizações utilizando as condições de m2.

### 3.4. Otimização das Condições para o Multiplex- PCR

De seguida, fizeram-se duas otimizações para conseguir as quatro bandas mais intensas e eliminar o aparecimento de bandas inespecíficas. Inicialmente fez-se a otimização da concentração de MgCl<sub>2</sub>, realizando-se 5 reações com 0,0 μM, 0,5 μM, 1 μM, 1,5 μM e 2 μM de concentração (Figura 3.3). Observou-se que a 1 μM de MgCl<sub>2</sub> as bandas foram mais intensas e como tal foi essa a concentração com melhores resultados.

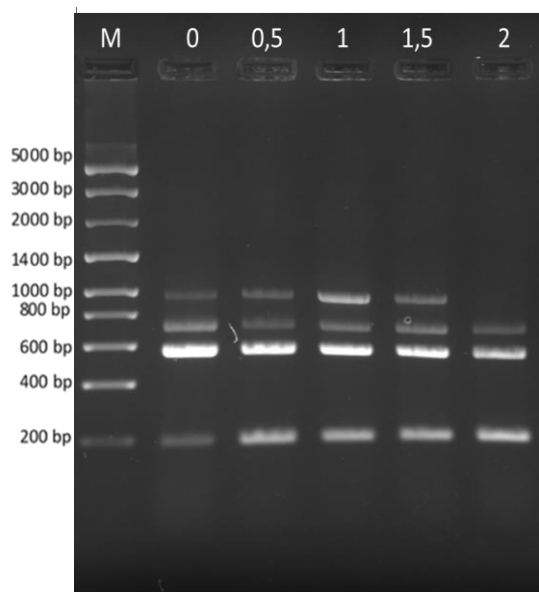


Figura 3.3. Gel de agarose com os resultados do multiplex-PCR com diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> (mM). *Vibrio anguillarum* (569bp), *Vibrio alginolyticus* (206bp), *Vibrio harveyi* (713bp) e *Yersinia ruckeri* (956 bp).

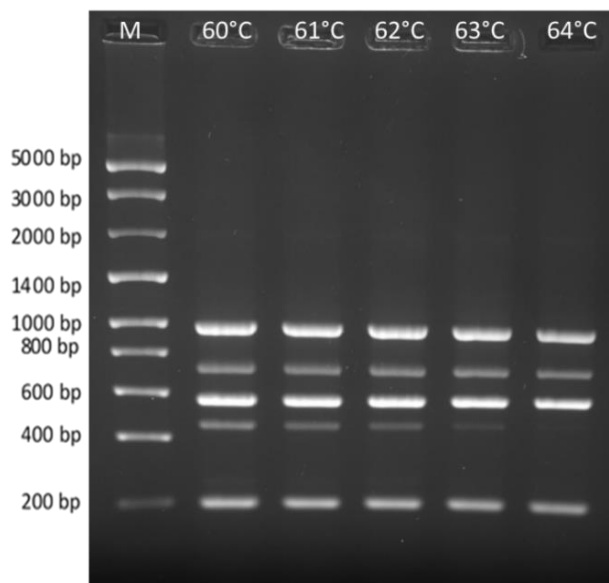


Figura 3.4. Gel de agarose com os resultados do multiplex-PCR em diferentes temperaturas de *annealing* (°C). *Vibrio anguillarum* (569bp), *Vibrio alginolyticus* (206bp), *Vibrio harveyi* (713bp) e *Yersinia ruckeri* (956 bp).

Na figura 3.4, observam-se os resultados obtidos com diferentes temperaturas de *annealing*. A 64 °C, as quatro bandas, correspondentes às quatro estirpes mantêm-se fortes, e não surgem bandas inespecíficas, pelo que, foi essa a temperatura escolhida. Assim, com as condições do multiplex otimizadas, ou seja, utilizando 1 μM de MgCl<sub>2</sub>, e 64 °C de temperatura de *annealing*, prosseguiu-se com a determinação da sensibilidade da ferramenta de m-PCR.

### 3.5. Sensibilidade da Ferramenta de Multiplex-PCR

Na testagem da sensibilidade da ferramenta de m-PCR tem-se como objetivo determinar até que concentração se consegue observar e identificar as diferentes bandas das estirpes em estudo.

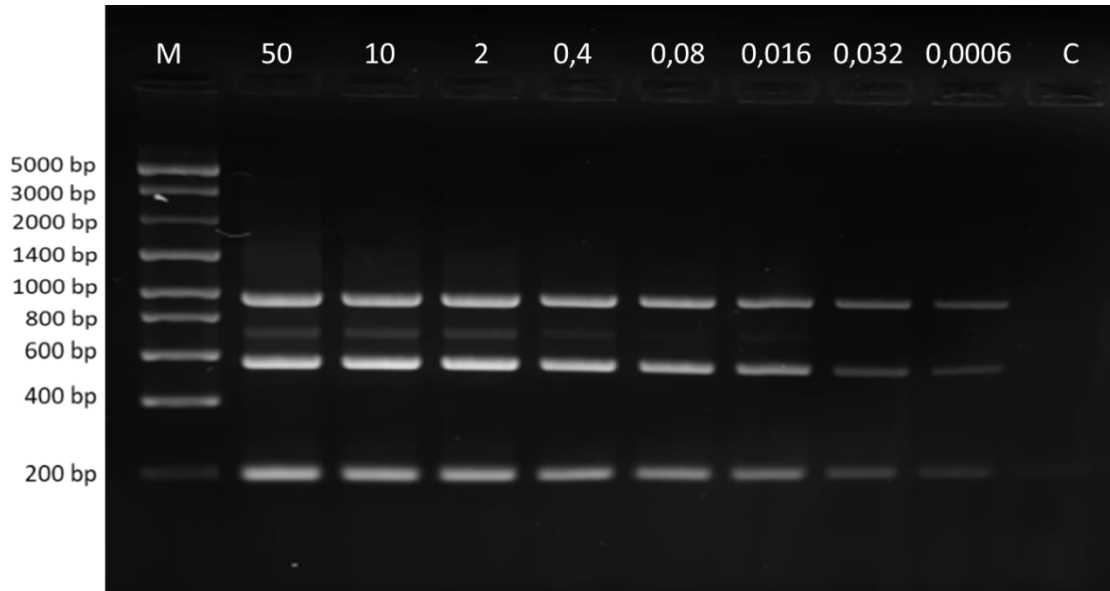


Figura 3.5. Gel de agarose com os resultados das reações de multiplex-PCR com diluições de ADN sucessivas (ng/μl). M- Marcador, C- Controlo negativo, Valores = concentração em ng/μl. *Vibrio anguillarum* (569bp), *Vibrio alginolyticus* (206bp), *Vibrio harveyi* (713bp) e *Yersinia ruckeri* (956 bp).

Para testar a sensibilidade da ferramenta realizou-se um m-PCR com diluições sucessivas de ADN 50 ng/μl a 0,6 pg/μl (Figura 3.5.). Observou-se que três das quatro estirpes apresentam bandas fortes e estão presentes até à última diluição realizada (0,6 pg/μl). Sendo assim, apenas *V. harveyi* possui uma sensibilidade menor sendo possível a sua observação até concentrações de 16 pg/μl.

### 3.6. Validação da Ferramenta

Aa ferramenta desenvolvida, foi validada para *Vibrio anguillarum* com amostras de tecidos de robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Tabela 3-2). Como é possível observar na figura 3.6, a ferramenta funcionou adequadamente para esta estirpe. Observam-se bandas fortes em todas as amostras, e com os tamanhos esperados, com a banda mais fraca correspondente a uma amostra de ADN extraída de rim após 9h de infeção, ainda perceptível. Nos peixes não infetados (controlos) os tecidos utilizados (rim e fígado) não apresentaram nenhuma banda, como expectável.

Tabela 3-2 Extrações utilizadas para a validação da estirpe. TI- Tempo de Infeção; T- Peso do Tecido; C- Concentração da Extração

	TI	0h	9h	24h	Moribundo (7 dias)
		Controlo	Infetado	Infetado	
Fígado	T	14,6mg	--	11,4 mg	11mg
	C	462ng/μl		661ng/μl	306ng/μl
Rim	T	11mg	30mg	--	2mg
	C	450ng/μl	190ng/μl		30,5ng/μl



Figura 3.6. Resultados do m-PCR para efeitos de validação da ferramenta com ADN de diferentes órgãos e horas de infeção. 1- Controlo com ADN extraído de fígado; 2- Fígado de um robalo infetado, após 24h; 3- ADN de Fígado de peixe moribundo; 4- Controlo com ADN extraído do Rim, 5- Rim após 9h de infeção; 6- ADN de Rim de peixe Moribundo; 7- Mix ADN utilizada; 8- ADN de *Vibrio anguillarum* (569bp); 9- Controlo da reação de PCR.



## **4. Discussão**

Com o crescimento da importância de sistemas de aquacultura cresce também o investimento não só em aquacultura diretamente, mas também indiretamente em ferramentas como a apresentada neste estudo para precaver através de diagnósticos precoces, e assim, indiretamente combater potenciais infeções que provocam prejuízos avultados (Bayliss *et al.*, 2017; Garlock *et al.*, 2020).

Entre essas doenças a Vibriose e a Doença Entérica da Boca Vermelha (DEBV) são das que mais afetam o setor da aquacultura (Haenen., 2017; Mohd-Aris *et al.*, 2019). Apesar de já existir medicação para o combate a estas doenças, principalmente antibióticos, estes são problemáticos visto que criam estirpes resistentes, podem afetar a saúde dos consumidores e o seu uso já tem algumas restrições com tendência a aumentar em alguns países (Menkem *et al.*, 2019; Mohd-Aris *et al.*, 2019; UE, 2006). Com as desvantagens apresentadas ao tentar combater as doenças, a melhor abordagem será a deteção precoce das estirpes destas provocarem as infeções. Esta é a principal vantagem do método de multiplex-PCR ao conseguir detetar a presença das estirpes patogénicas antes que desenvolvam a infeção. Ao se conseguir a deteção precoce das estirpes com potencial infeccioso consegue-se intervir de forma a evitar a infeção e contágio. Por exemplo conseguir-se-ia administrar antibióticos de uma forma mais eficaz após a deteção das estirpes patogénicas ao invés de administrar antibióticos por sistema. Desta forma, evitar-se-iam ou reduzir-se-iam as desvantagens apresentadas pelos antibióticos e/ou outros métodos de combate a doenças, e possivelmente seria uma forma mais vantajosa do ponto de vista económico. Com isto, o presente estudo tem como objetivo o desenvolvimento de uma ferramenta de ADN sensível que permita a deteção rápida e fiável das estirpes causadoras da vibriose e DEBV.

#### **4.1. Extração de ADN**

As extrações para apresentarem um grau de purificação mais elevado deveriam apresentar no ratio de 260/280 valores a rondar 1,8. Valores muito abaixo desse significam uma provável contaminação com proteínas, fenóis ou outros contaminantes que absorvam a 280 nm (NanoDrop, 2007; Thermo Scientific, 2012). Este valor pode também ser afetado por outros fatores como ligeiras variações do pH das amostras ou o próprio espectrofotómetro (NanoDrop, 2007; Thermo Scientific, 2012).

Nas amostras apresentadas o ratio de 260/280 variou entre 1,74 para *V. anguillarum* e 2,02 para *Y. ruckeri* o que demonstra, pelo menos seguindo este ratio, um grau de pureza elevado sendo *Y. ruckeri* a estirpe que mais se distancia de 1,8, valor este apenas conseguido em *V. harveyi*. Valores mais elevados deste ratio podem ser afetados entre 0,2 e 0,3 se a solução for básica (Lucena-Aguilar *et al.*, 2016; NanoDrop, 2007).

Em relação ao ratio 260/230, este deveria possuir valores semelhantes ou mais elevados que os do ratio 260/280 para significar que a amostra é pura. Caso este seja consideravelmente mais baixo que o ratio 260/280 isto significa que existem contaminantes que absorvem a 230 nm como hidratos de carbono, fenóis e cloreto de guanidina (Lucena-Aguilar *et al.*, 2016; NanoDrop, 2007).

Nas presentes amostras estes valores foram sempre muito mais baixos que o suposto para serem consideradas puras. Em todas as estirpes estes foram consideravelmente mais baixos que os de 260/280, para além disso todos ficaram abaixo de 2 com o maior valor de 1,5 para *Y. ruckeri*.

Os valores de ambos os ratios não foram ótimos, mas podem dever-se ao método de extração de ADN utilizado, o método de fervura. Este método possui várias vantagens como o baixo custo e a simplicidade de realizar o método, no entanto também possui algumas desvantagens destacando-se a inespecificidade: sendo possível a obtenção de quantidades de ADN algo variáveis e também com a presença de alguns contaminantes, o afetará o grau de pureza do ADN (Barbosa, *et al.*, 2016).

Mesmo com valores não ideais para as extrações de ADN, a ferramenta desenvolvida apresenta como resultados a presença de bandas fortes no PCR, para todas as estirpes o que significa que os *primers* utilizados têm uma boa seletividade como discutido em 4.2.

#### **4.2. Desenvolvimento e Validação da Ferramenta de m-PCR**

Como sugerido várias vezes ao longo do presente estudo, uma ferramenta de m-PCR para a deteção de doenças como as provocadas pelas estirpes utilizadas neste estudo é essencial para prevenir surtos de doença em tanques de aquacultura.

Tal como demonstrado em 3.3, inicialmente nos multiplex-PCR realizados obteve-se uma banda indesejada de tamanho inferior à banda esperada de *V. anguillarum* (cerca de 500 bp), esta dever-se-á a contaminações por outros ADNs presentes na reação, hipótese confirmada por m2, visto que ao se realizar uma nova mistura dos *primers* essa banda desapareceu sugerindo que a contaminação estaria na *mix* dos *primers*. No entanto, existem também outras explicações dentro das quais o facto da técnica de m-PCR ser menos sensível que o PCR convencional pois nesta técnica existem múltiplas estirpes e mais que um conjunto de *primers* em competição entre si e por reagentes (De Cássia-Pires *et al.*, 2017; Maddocks & Jenkins, 2017; Roche Life Science, 2015.)

De qualquer forma o estudo prosseguiu com m2, visto que nesse multiplex a remistura dos *primers* eliminou a banda extra sugerindo que a mistura dos *primers* utilizada previamente estaria contaminada. Os próximos passos de otimização foram decisivos para um resultado final positivo.

A otimização de m-PCRs como descrito originalmente por Zangenberg *et al.*, (1999) pode ser realizada em todos os parâmetros utilizados na reação: alterar a concentração de *primers*, de MgCl<sub>2</sub> e/ou de Taq polimerase, alterar o tempo de extensão, número de ciclos e temperatura de *annealing*. Dentro desses passos foram realizadas otimizações ao nível da concentração de MgCl<sub>2</sub> e da temperatura de *annealing*.

Na figura 3.3 observam-se os efeitos de diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> sendo que a concentração, que deu origem a bandas mais fortes foi de 1 µM. A otimização deste parâmetro é crucial pois a concentração de iões de Mg<sup>2+</sup> influencia a reação: se for uma concentração demasiado elevada pode levar a um deficiente *melting* do ADN, promovendo a ligação não-específica de *primers*, uma concentração baixa de Mg<sup>2+</sup> pode ter um efeito adverso no rendimento do produto final (Dhatterwal *et al.*, 2017).

Quanto à temperatura de *annealing*, como se pode observar na figura 3.4, neste gel a banda extra indesejada abaixo de *V. anguillarum* (cerca de 500bp) voltou nas temperaturas mais baixas o que ajudou a selecionar a temperatura ideal para correr as reações, que neste caso foi de 64°C que já era a temperatura utilizada até este ponto. Nesta temperatura a banda extra desaparece mantendo-se, no entanto, as quatro bandas desejadas e intensas. De acordo com Piñol *et al.*, (2015) quanto mais alta a temperatura de *annealing* maior a especificidade da reação, o que foi comprovado pelo resultado obtido. Isto reforça a ferramenta visto que mesmo

sem um grau de pureza elevado para este ensaio a ferramenta revelou boa especificidade, o que é importante para ser aplicada em casos práticos.

Com as condições devidamente otimizadas seguiu-se o teste de sensibilidade da ferramenta. Neste, como se pode observar na figura 3.5, obtiveram-se bandas até 0,6 pg/μl para *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* e *Y. ruckeri*. No caso de *V. harveyi* a última banda obtida, muito ténue conseguiu-se a 1,6 pg/μl. Todos estes resultados demonstram uma sensibilidade mais elevada comparando com os poucos trabalhos prévios como Pinto *et al.*, (2017) e Ferreira, (2018). Tendo Ferreira (2018) obtido a sua maior sensibilidade em *V. anguillarum* com 0,01 ng/μl e Pinto *et al.*, (2017) 0,4 ng/μl para a mesma estirpe. Também para *V. anguillarum*, Tapia-Cammas *et al.*, (2011), obteve um limite de deteção de 0,05 ng/μl. Para *V. anguillarum* e *V. alginolyticus*, Kim *et al.*, (2019), também conseguiu sensibilidades menos boas com o máximo de 0,05 ng/μl, e para *V. harveyi* conseguiu obter 5 pg/μl, também menos boa que a obtida no presente estudo.

Os resultados obtidos demonstram uma grande sensibilidade da ferramenta o que é essencial quando se trata de amostras de peixes de tanques de aquacultura em que a concentração de ADN de patógenos existirá sempre em quantidades muito pequenas.

Finalmente realizou-se a validação da ferramenta (figura 3.6.), para *V. anguillarum* com tecidos de robalo (*Dicentrarchus labrax*) nomeadamente o fígado e o rim. A escolha destes tecidos deve-se ao facto de os patógenos colonizarem primeiro os tecidos mais vascularizados como o rim, o fígado, guelras, coração e baço (Crisafi *et al.*, 2011). Neste ensaio foram utilizadas extrações de ADNs com diferentes horas após a infeção inicial de tecidos dos dois órgãos, rim e fígado, de robalos (*D. labrax*).

Normalmente o multiplex PCR apresenta problemas de sensibilidade especialmente quando não se trata ADN puro pois existe uma mistura de diversos ADN's no tecido e uma quantidade muito reduzida do ADN alvo (Markoulatos *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2019). No presente estudo este não foi o caso, pois a validação foi bem-sucedida. Isto vem validar a enorme seletividade e sensibilidade dos *primers* e do método em si. Os estudos que façam a validação em tecidos são raros pelas dificuldades já mencionadas, porém, Ferreira (2018) conseguiu também validar para *V. alginolyticus* com algum sucesso a ferramenta que desenvolveu com as três espécies de vibrio desenvolvidas no presente estudo.

Os resultados da validação foram coerentes com o tempo de infecção. Tanto no rim como no fígado as bandas demonstraram ser mais fortes quando maior o tempo decorrido desde a infecção inicial, isto deve-se à multiplicação das bactérias. A intensidade das bandas foi elevada em geral, sendo apenas mais fraca para a extração de ADN correspondente ao rim com 9 horas após a infecção inicial. Isto sugere que, comparando com as bandas do multiplex da sensibilidade da ferramenta (figura 3.5.), que esta possui capacidade para detetar infeções com menor tempo de desenvolvimento, pois na validação a elevada intensidade das bandas demonstram quantidades de ADN muito superiores ao limite mínimo de deteção da ferramenta demonstrado no multiplex de sensibilidade.

Como previamente referido, as doenças são uma parte integrante em aquacultura e um fator limitante ao desenvolvimento do setor. Setor este que visa tornar-se cada vez mais essencial com a crescente escassez de peixe nos oceanos e aumento da procura por parte dos consumidores. Apesar de existirem alguns métodos e fármacos que visam tratar algumas das doenças estes têm as suas vantagens superadas pelas suas desvantagens como os efeitos secundários que possam ocorrer no consumidor final, ou as estirpes resistentes que possam surgir (Menkem *et al.*, 2019). Daí, ferramentas que visem prevenir que a infecção ocorra ao permitir uma deteção precoce, são e serão cada vez mais essenciais para o desenvolvimento sustentado da indústria por todo o mundo. O equipamento necessário para a utilização desta ferramenta pode nem sempre estar presente em empresas de aquacultura, no entanto seria um bom investimento em longo termo pois possivelmente seria compensado pela quantidade de peixes e tanques que salvaria, e assim prejuízos. Para além do equipamento, os consumíveis não são muito dispendiosos, logo, a seguir ao investimento inicial este método tornar-se-ia um método simples, eficaz, sensível e barato de operar.

Os resultados demonstrados pela ferramenta desenvolvida neste estudo demonstram que esta tem o potencial para ser utilizada em casos práticos em tanques de aquacultura. Apesar de necessitar de validação para as outras três estirpes, a sensibilidade da ferramenta foi, em geral, muito maior que os restantes estudos já desenvolvidos (Pinto *et al.*, (2017); Ferreira, (2018); Tapia-Cammas *et al.*, (2011); Kim *et al.*, (2019).

Este tipo de ferramenta também possui a vantagem de poder ser utilizada para a deteção de uma única estirpe patogénica (um tipo de infecção) bem como várias estirpes ao mesmo tempo (várias infeções) tudo na mesma ferramenta.

Com isto, a ferramenta desenvolvida no presente estudo apresenta capacidade e com isto sensibilidade e seletividade para ser utilizada em aquaculturas. Isto pode ser uma mais-valia, podendo preservar muitos tanques de aquacultura e assim salva guardando muitas empresas de prejuízos. Este método preventivo de detetar os patógenos utilizando uma ferramenta de multiplex-PCR demonstra ser eficaz, rápido, não problemático para a saúde dos consumidores (como acontece com a administração de antibióticos) e possivelmente mais *cost-effective*.



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

Os resultados obtidos no desenvolvimento de uma ferramenta de multiplex-PCR para a detecção simultânea de *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* e *Y. ruckeri* demonstram que a ferramenta proposta possui boa sensibilidade e seletividade para todas as estirpes em questão, sendo também um método rápido e simples de executar e pouco dispendioso. Esta ferramenta possui potencial para ser aplicada em aquacultura para a detecção atempada destas estirpes, sendo um sistema de alerta precoce para o desenvolvimento de patologias como a vibriose e a DEBV, permitindo consequentemente evitar prejuízos financeiros mais avultados. Futuramente a ferramenta deverá ser validada para as outras estirpes e se possível em sangue visto que a sua recolha requer uma técnica muito menos invasiva facilitando a recolha de amostras e a mais fácil monitorização em aquacultura sem sacrificar a vida do peixe. Outro aspeto a melhorar seria a técnica, tentando aplicar esta ferramenta a outros métodos moleculares como PCR quantitativo (qPCR) em vista de melhorar ainda mais a eficiência do método tornando-o ainda mais rápido.

## **6. Referências**

- Adams, A., & Thompson, K. D. (2011). Development of diagnostics for aquaculture: Challenges and opportunities. *Aquaculture Research*, 42(SUPPL. 1), 93–102. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02663.x>
- Altinok, I., Capkin, E., & Kayis, S. (2008). Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. *Veterinary Microbiology*, 131(3–4), 332–338. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.014>
- Assefa, A. (2018). Maintenance of Fish Health in Aquaculture : Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. *Veterinary Medicine International*. Disponível em <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
- Austin, B. (2019). Methods for the diagnosis of bacterial fish diseases. *Marine Life Science & Technology*, 1(1), 41–49. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s42995-019-00002-5>
- Austin, B., & Zhang, X. (2006). *Vibrio harveyi* : a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. 43, 119–124. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x>
- Barbosa, C., Nogueira, S., Gadanho, M., & Chaves, S. (2016). DNA extraction: Finding the most suitable method. In *Molecular Microbial Diagnostic Methods: Pathways to Implementation for the Food and Water Industries*. Disponível em <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416999-9.00007-1>
- Barnes, A. C., Delamare-Deboutteville, J., Gudkovs, N., Brosnahan, C., Morrison, R., & Carson, J. (2016). Whole genome analysis of *Yersinia ruckeri* isolated over 27 years in Australia and New Zealand reveals geographical endemism over multiple lineages and recent evolution under host selection. *Microbial Genomics*, 2(11), e000095. Disponível em <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000095>
- Bayliss, S. C., Verner-Jeffreys, D. W., Bartie, K. L., Aanensen, D. M., Sheppard, S. K., Adams, A., & Feil, E. J. (2017). The promise of whole genome pathogen sequencing for the molecular epidemiology of emerging aquaculture pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–18. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00121>

- Bunpa, S., Nishibuchi, M., Thawonsuwan, J., & Sermwittayawong, N. (2018). Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* strains, and design of a PCR-based identification method using gyrB gene sequence. *Canadian Journal of Microbiology*, 64(1), 1–10. Disponível em <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0269>
- Cerro, A., Marquez, I., & Guijarro, J. A. (2002). *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, Three Major Fish Pathogens , by Multiplex PCR. *Society*, 68(10), 5177–5180. Disponível em <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5177>
- Chapela, M. J., Ferreira, M., Varela, C., Arregui, L., & Garrido-Maestu, A. (2018). Development of a multiplex real-time PCR method for early diagnosis of three bacterial diseases in fish: A real-case study in trout aquaculture. *Aquaculture*, 496, 255–261. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.003>
- 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(3), 223–230. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.11.004>
- Cuéllar-Anjel, J. (2013). Vibriosis Vibriosis. *The Center for Food Security & Public Health*, 1 de 5. Disponível em <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
- De Cássia-Pires, R., De Melo, M. D. F. A. D., Da Hora Barbosa, R., & Roque, A. L. R. (2017). Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. KDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts. *PLoS ONE*, 12(3), 1–12. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173922>
- Dhatterwal, P., Mehrotra, S., & Mehrotra, R. (2017). Optimization of PCR conditions for amplifying an AT-rich amino acid transporter promoter sequence with high number of tandem repeats from *Arabidopsis thaliana*. *BMC Research Notes*, 10(1), 1–4. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2982-1>
- Dubert, J., Osorio, C. R., Prado, S., & Barja, J. L. (2016). Persistence of Antibiotic Resistant *Vibrio* spp. in Shellfish Hatchery Environment. *Microbial Ecology*, 72(4), 851–860. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0705-5>

- Edwards, M. C., & Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: Advantages, development, and applications. *Genome Research*, 3(4). Disponível em <https://doi.org/10.1101/gr.3.4.S65>
- Elmahdi, S., DaSilva, L. V., & Parveen, S. (2016). Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. *Food Microbiology*, 57, 128–134. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.02.008>
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 559–570. Disponível em <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.559-570.2000>
- Espiñeira, M., Atanassova, M., Vieites, J. M., & Santaclara, F. J. (2010). Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. *Food Microbiology*, 27(1), 122–131. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.09.004>
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. In *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. Disponível em <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Ferreira, A., (2018). *Desenvolvimento e validação de uma ferramenta molecular de multiplex-PCR para a detecção de Vibrio alginolyticus, Vibrio anguillarum e Vibrio harveyi em peixes de aquacultura*. Disponível em <http://hdl.handle.net/10400.8/3237>
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., & Rediers, H. (2011). *Review Vibrio anguillarum as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention*. 643–661. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x>
- Fu, K., Li, J., Wang, Y., Liu, J., Yan, H., Shi, L., & Zhou, L. (2016). *An Innovative Method for Rapid Identification and Detection of Vibrio alginolyticus in Different Infection Models Bacterial Strains and Growth Condition*. 7(May), 1–10. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00651>
- Gao, X., Pi, D., Chen, N., Li, X., Liu, X., Yang, H., & Wei, W. (2018). *Survival, Virulent Characteristics, and Transcriptomic Analyses of the Pathogenic Vibrio anguillarum Under Starvation Stress Bacterial Strains and Starvation Stress*. 8(November), 1–12. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00389>

- Garlock, T., Asche, F., Anderson, J., Bjørndal, T., Kumar, G., Lorenzen, K., ... Tveterås, R. (2020). A Global Blue Revolution: Aquaculture Growth Across Regions, Species, and Countries. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 28(1), 107–116. Disponível em <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1678111>
- Gigia-aguirre, L. Del. (2017). First description of wound infection with *Vibrio harveyi* in Spain. *New Microbes and New Infections*, 19(January), 15–16. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.05.004>
- Guijarro, J. A., García-Torrice, A. I., Cascales, D., & Méndez, J. (2018). The infection process of *Yersinia ruckeri*: Reviewing the pieces of the Jigsaw puzzle. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JUN), 1–10. Disponível em <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00218>
- Haenen, O.(2017). MAJOR BACTERIAL DISEASES AFFECTING AQUACULTURE. *Aquatic AMR Workshop*.
- Huang, H. S., Tsai, C. L., Chang, J., Hsu, T. C., Lin, S., & Lee, C. C. (2018, October 1). Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 24, pp. 1055–1063. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.018>
- Ina-Salwany M.Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Fathin-Amirah M., Mohd, A., Amal, M.N.A., Kasai H., Mino S., Sawabe T., Zamri-Saad, M., (2019). Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. Disponível em <https://10.1002/aah.10045>
- Kim I. K., Won, K. M., Lee, E. S., Cho, M., Jung, S. H., & Kim, M. S. (2019). Detection of *Vibrio* and ten *Vibrio* species in cage-cultured fish by multiplex polymerase chain reaction using house-keeping genes. *Aquaculture*, 506(March), 417–423. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.073>
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*, 46(1), 1–10. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0238-4>

- Le Roux F., Wegner KM., Baker-Austin C., Vezzulli L., Osorio CR., Amaro C., Ritchie JM., Defoirdt T., Destoumieux-Garzón D., Blokesch M, Mazel D., Jacq A., Cava F., Gram L., Wendling CC., Strauch E., Kirschner A., Huehn S. (2015) The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Frontiers in Microbiology*. 6:830. Disponível em doi: 10.3389/fmicb.2015.00830
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). ADN Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270. Disponível em <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Maddocks, S., & Jenkins, R. (2017). *Understanding PCR: a practical bench-top guide*. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012802683000006X>
- Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47–51. Disponível em <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>
- Menanteau-Ledouble, S., Lawrence, M. L., & El-Matbouli, M. (2018). Invasion and replication of *Yersinia ruckeri* in fish cell cultures. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–11. Disponível em <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1408-1>
- Menkem, Z. E., Ngangom, B. L., Tamunjoh, S. S. A., & Boyom, F. F. (2019). Antibiotic residues in food animals: Public health concern. *Acta Ecologica Sinica*, 39(5), 411–415. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.10.004>
- Messelhäusser, U., Colditz, J., Thäringen, D., Kleih, W., Höller, C., & Busch, U. (2010). Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, 142(3), 360–364. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.020>
- Mishra, S. S., Das, R., Sahoo, S. N., & Swain, P. (2019). Biotechnological tools in diagnosis and control of emerging fish and shellfish diseases. Em *Genomics and Biotechnological Advances in Veterinary, Poultry, and Fisheries*. Disponível em <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816352-8.00014-X>

- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., Deboeck, G., & Mohanta, K. N. (2013). Aquaculture and stress management: A review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(3), 405–430. Disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x>
- Mohd-Aris, A., Muhamad-Sofie, M. H. N., Zamri-Saad, M., Daud, H. M., & Yasin Ina-Salwany, M. (2019). Live vaccines against bacterial fish diseases: A review. *Veterinary World*, 12(11), 1806–1815. Disponível em <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1806-1815>
- Montánchez, I., Ogayar, E., Plágaro, A. H., & Esteve-codina, A. (2019). *adaptation in sea water microcosms at elevated temperature provides insights into the putative mechanisms of its persistence and spread in the time of global warming*, 1–12. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36483-0>
- Mustapha, S., Mustapha, E. M., & Nozha, C. (2013). *Vibrio Alginolyticus : An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases Vibrio Alginolyticus : An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases*. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/236214804>
- NanoDrop, I. (2007). *260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop® ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers - Technical Support Bulletin T009*. 8–9. Retrieved from Disponível em [http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop\\_tip.pdf](http://www.bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf)
- Novriadi, R. (2016). Vibriosis in aquaculture. *Omni-Akuatika*, 12(1). Disponível em <https://doi.org/10.20884/1.oa.2016.12.1.24>
- OECD. (2020). Fisheries and aquaculture. Retrieved April 2, 2021, from Disponível em <https://www.oecd.org/agriculture/topics/fisheries-and-aquaculture/>
- Piñol, J., Mir, G., Gomez-Polo, P., & Agustí, N. (2015). Universal and blocking *primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods*. *Molecular Ecology Resources*, 15(4), 819–830. Disponível em <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12355>

- Pinto, M. F., Baptista, T., & Neves Afonso, C. C. (2017). Development of a new multiplex-PCR tool for the simultaneous detection of the fish pathogens *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi* and *Edwardsiella tarda*. *Aquatic Living Resources*, 30, 4. Disponível em <https://doi.org/10.1051/alr/2017005>
- Premier Biosoft (s.d.). *Multiplex PCR*. Consultado em 2021, Janeiro 15. Disponível em [http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/multiplex-pcr.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/multiplex-pcr.html)
- Rehman, S., Gora, A. H., Ahmad, I., & Rasool, S. I. (2017). Stress in Aquaculture Hatcheries: Source, Impact and Mitigation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10), 3030–3045. Disponível em <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.610.357>
- Roche Life Science (2015). Compare and Contrast: Multiplex vs. Singleplex PCR Retrieved February 2, 2021, Disponível em [https://lifescience.roche.com/en\\_pt/blog/lab-life/real-time-pcr/compare-and-contrast-multiplex-vs-singleplex-pcr.html](https://lifescience.roche.com/en_pt/blog/lab-life/real-time-pcr/compare-and-contrast-multiplex-vs-singleplex-pcr.html)
- Shefat, S., (2018). Vaccines for Use in Finfish Aquaculture. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 2(11), 15–19.
- Sinatra JA, Colby K. Notes from the Field: Fatal *Vibrio anguillarum* Infection in an Immunocompromised Patient — Maine, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018;67:962–963. Disponível em <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6734a5external> icon.
- Tan, D., & Gram, L. (2014). *Vibriophages and Their Interactions with the Fish Pathogen Vibrio anguillarum*. 80(10), 3128–3140. Disponível em <https://doi.org/10.1128/AEM.03544-13>
- 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(2), 135–142. Disponível em <https://doi.org/10.3354/dao02395>
- Thangaraj, S., Alavandi, S., Poornima, M., (2017). Immunostimulants in Aquaculture. *Compendium on Prophylaxis in Aquaculture*, pp-175-185. Disponível em [https://www.researchgate.net/publication/322635454\\_Immunostimulants\\_in\\_Aquaculture](https://www.researchgate.net/publication/322635454_Immunostimulants_in_Aquaculture)

- Thermo Scientific, D. (2012). NanoDrop Lite: Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. *Protocols and Product Manuals*, (T123).
- Towers, L., (2014). Antibiotics in Aquaculture Are They Needed? | The Fish Site. Retrieved March 23, 2020, Disponível em <https://thefishsite.com/articles/antibiotics-in-aquaculture-are-they-needed>
- Tsai, Y. H., Chen, P. H., Yu, P. A., Chen, C. L., Kuo, L. T., & Huang, K. C. (2019). A multiplex PCR assay for detection of *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus agalactiae* from the isolates of patients with necrotizing fasciitis. *International Journal of Infectious Diseases*, 81, 73–80. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.037>
- Tsuji, S., Iguchi, Y., Shibata, N., Teramura, I., Kitagawa, T., & Yamanaka, H. (2018). Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of multiple species from environmental ADN: An application on two Japanese medaka species. *Scientific Reports*, 8(1), 9138. Disponível em <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27434-w>
- UE. (2006). Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. *Regulation*, (December 2005), Disponível em [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP\\_05\\_1687](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_1687)
- Wrobel, A., Leo, J. C., & Linke, D. (2019). Overcoming fish defences: The virulence factors of *Yersinia ruckeri*. *Genes*, 10(9). Disponível em <https://doi.org/10.3390/genes10090700>
- Zangenberg, G., Saiki, R. K., & Reynolds, R. (1999). Multiplex PCR: optimization guidelines. *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, 73–94.
- Zhao, J., Li, X., Hou, X., Quan, C., & Chen, M. (2019). Widespread existence of quorum sensing inhibitors in marine bacteria: Potential drugs to combat pathogens with novel strategies. *Marine Drugs*, 17(5). Disponível em <https://doi.org/10.3390/md17050275>