



**POLITÉCNICO
DE LEIRIA**

ESCOLA SUPERIOR
DE TURISMO E
TECNOLOGIA DO MAR

***Pesquisa de fatores de patogenicidade e de resistência
antimicrobiana em bactérias ictiopatógenicas***

Lourenço Miguel Pinto Pereira Dias

2021

***Pesquisa de fatores de patogenicidade e de resistência
antimicrobiana em bactérias ictiopatógenicas***

Lourenço Miguel Pinto Pereira Dias

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação realizada sob a orientação da Doutora Maria Jorge Geraldes Campos e da Especialista Teresa Maria Coelho Baptista

2021

Título: Pesquisa de fatores de patogenicidade e de resistência antimicrobiana em bactérias ictiopatógenicas

© Lourenço Miguel Pinto Pereira Dias

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar –Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2021

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

Agora que finalizo este trabalho que constituiu um desafio importante na minha vida gostava de agradecer em primeiro lugar aos meus pais, Paula e Carlos, por me apoiarem em todas as decisões que fui tomando ao longo da minha vida e por me incentivarem a tomar os melhores rumos, obrigado por todas as palavras de carinho que me deram durante esta etapa e por todos conselhos, eles são o meu maior pilar e sem eles nada disto teria sido possível.

Um muito obrigado ao Pedro por ser um exemplo para mim, mesmo estando longe estiveste sempre lá quando precisei para me animar e colocar sempre um sorriso na cara.

Às minhas orientadoras, Doutora Maria Jorge Geraldês Campos e a Especialista Teresa Maria Coelho Baptista por terem aceitado trabalhar comigo, por tudo o que me ensinaram, por toda a preocupação e apoio demonstrado por mim e pelo meu trabalho, mostrando-se sempre disponíveis para me ajudarem.

Um grande obrigado à Cátia, ao Christian e ao Marco por todo o conhecimento que me transmitiram assim como toda a ajuda nas dificuldades que fui encontrando ao longo deste longo caminho.

Um especial obrigado à Elisa, por sempre acreditar nas minhas capacidades e por me ter incentivado a continuar e a nunca desistir, por todo o carinho, paciência, dedicação, compreensão, amizade e amor dado ao longo deste percurso. Sem dúvida que sem ti, tudo isto teria sido um caminho muito mais difícil.

Um obrigado a todas as pessoas de Peniche que me apoiaram, em especial à Beatriz, ao David e ao Francisco que estiveram comigo desde que este longo caminho começou lembrando-me sempre que existe mais na vida que o trabalho, são sem dúvida, imprescindíveis.

Um obrigado ao Instituto Politécnico de Leiria e ao CETEMARES por permitirem que eu desenvolvesse este trabalho.

Espero um dia poder retribuir a todos o que fizeram por mim durante este período da minha vida e espero que encontrem nestas palavras o meu agradecimento sincero a todos.

Resumo

Uma das principais ameaças na área da aquacultura são as perdas económicas originadas por surtos de doenças infecciosas resultando na alta mortalidade dos cultivos. Atualmente, a patogenicidade e a resistência a antibióticos, de bactérias ictiopatógenicas é um problema sério que se agrava a cada dia, tornando-se num tópico de grande importância. O objetivo deste trabalho é estudar características fenotípicas e genes de virulência assim como genes de resistência a antimicrobianos de diferentes estirpes de bactérias ictiopatógenicas. Para tal, foram realizados testes fenotípicos de virulência e avaliada a presença de genes de virulência e de resistência a antimicrobianos, em diferentes estirpes de: *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* e *Yersinia ruckeri*. Foram estudadas seis estirpes ictiopatógenicas: *Vibrio alginolyticus* 12M CECTS21, *Vibrio anguillarum* 10J AQV 55, *Vibrio harveyi* Vh-017/18, *Vibrio harveyi* DSM 19623, *Yersinia ruckeri* QSP 57.1 e *Yersinia ruckeri* DSM 18506. Foram realizados cinco testes fenotípicos de virulência: proteolítico, lipolítico, formação de biofilmes, gelatinase e hemolítico. Para o proteolítico apresentaram resultados positivos as estirpes *Vibrio harveyi* Vh 017/16, *Yersinia ruckeri* DSM 18506, *Yersinia ruckeri* QSP 57.1, e para *Vibrio anguillarum* V10J AQV 55. No teste lipolítico apresentaram resultados positivos, *Vibrio harveyi* Vh 017/16, *Yersinia ruckeri* QSP 57.1, *Vibrio anguillarum* V10J AQV55 e *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21. Para a formação de biofilmes as estirpes *Vibrio harveyi* Vh 017/16, *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21 e *Vibrio anguillarum* V10J AQV55 apresentaram resultados positivos. No teste da gelatinase foram verificados resultados positivos nas estirpes *Vibrio harveyi* Vh 017/16, *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21 e *Vibrio harveyi* DSM 19623. Por fim para o teste da hemolisina apresentaram resultados positivos, *Yersinia ruckeri* QSP 57.1 e *Vibrio anguillarum* V10J AQV55. A presença de genes de virulência, determinada por PCR, foi realizada para um total de 17 genes de virulência específicos de ictiobactérias (*ctxA*, *ompU*, *zot*, *tcpA(ToxR)*, *tcpA (El Tor)*, *tcpI*, *hlyA*, *hlyA (El Tor)*, *stn/sto*, *luxR*, *vhh,vvh*, *yrp1*, *ompK*, *tlh*, *VPI*, *toxR*) e para 23 genes de resistência (*qnrS*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qepA*, *blaIMP*, *blaVIM*, *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA*, *blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM*, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9*). Foi possível detetar o gene de virulência *luxR* para a estirpe *Vibrio harveyi* Vh-017/18 e os genes de virulência *luxR* e *toxR* para a estirpe *Vibrio alginolyticus* 12M CECTS21. A pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos mostrou que nenhuma das estirpes possui genes que confirmam resistência às quinolonas, colistina nem a β -lactamases de largo espectro.

Palavras-chave: Aquacultura, bactérias ictiopatógenicas, *Yersinia ruckeri*, resistência, *Vibrio*, virulência.

Abstract

One of the main threats in aquaculture is the economic losses caused by outbreaks of infectious diseases resulting in high mortality of fish cultures. Currently, the pathogenicity and antibiotic resistance of ichthyopathogenic bacteria is a serious problem that worsens every day, becoming a topic of great importance. The objective of this work is to study phenotypic characteristics and virulence genes as well as antimicrobial resistance genes of different strains of ichthyopathogenic bacteria. For this, phenotypic virulence tests were performed, the presence of virulence and antimicrobial resistance genes was evaluated in different strains of: *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* and *Yersinia ruckeri*. Six ichthyogenic strains were studied: *Vibrio alginolyticus* 12M CECTS21, *Vibrio anguillarum* 10J AQV 55, *Vibrio harveyi* Vh-017/18, *Vibrio harveyi* DSM 19623, *Yersinia ruckeri* QSP 57.1 and *Yersinia ruckeri* DSM 18506. Five phenotypic virulence tests were performed: proteolytic, lipolytic, biofilm formation, gelatinase and hemolytic. *Vibrio harveyi* Vh 017/16, *Yersinia ruckeri* DSM 18506, *Yersinia ruckeri* QSP 57.1, and *Vibrio anguillarum* V10JAQV 55 were positive for proteolytic strains. In the lipolytic test showed positive results, *Vibrio harveyi* Vh 017/16 *Yersinia ruckeri* QSP 57.1, *Vibrio anguillarum* V10J AQV55 and *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21. For the formation of biofilms showed positive results, namely *Vibrio harveyi* Vh 017/16, *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21 and *Vibrio anguillarum* V10J AQV55. The gelatinase test showed positive results, *Vibrio harveyi* Vh 017/16, *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21 and *Vibrio harveyi* DSM 19623. Finally, for the hemolysin test, *Yersinia ruckeri* QSP 57.1 and *Vibrio anguillarum* V10J AQV55 showed positive results. The presence of virulence genes, determined by PCR, was performed for a total of 17 specific virulence genes of ichthyobacteria (*ctxA*, *ompU*, *zot*, *tcpA(ToxR)*, *tcpA(El Tor)*, *tcpI*, *hlyA*, *hlyA(El Tor)*, *stn/sto*, *luxR*, *vhh*, *vvh*, *yrp1*, *ompK*, *tlh*, *VPI*, *toxR*) and for 23 resistance genes (*qnrS*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qepA*, *blaIMP*, *blaVIM*, *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA*, *blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM*, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9*). It was possible to detect the *luxR* virulence gene for the *Vibrio harveyi* Vh-017/18 strain and the *luxR* and *toxR* virulence genes for the *Vibrio alginolyticus* 12M CECTS 21 strain. Research on antimicrobial resistance genes has shown that none of the strains have genes that confer resistance to quinocins, colistin, or β -lactamases.

Keywords: Aquaculture, ichthyopathogenic bacteria, *Yersinia ruckeri*, resistance, *Vibrio*, virulence.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Aquacultura Mundial.....	1
1.2.	Aquacultura em Portugal.....	2
1.3.	Doenças e bactérias patogénicas de peixes.....	3
1.3.1.	Vibriose.....	4
1.3.2.	Yersiniose.....	4
1.4.	Género <i>Vibrio</i>	5
1.4.1.	<i>Vibrio harveyi</i>	6
1.4.2.	<i>Vibrio anguillarum</i>	7
1.4.3.	<i>Vibrio alginolyticus</i>	8
1.4.4.	Deteção fenotípica de espécies da família <i>Vibrionaceae</i>	9
1.4.5.	Testes fenotípicos para <i>Vibrio</i>	9
1.4.6.	Genes de Virulência para <i>Vibrio</i>	10
1.5.	<i>Yersinia ruckeri</i>	11
1.5.1.	Testes fenotípicos para <i>Yersinia ruckeri</i>	12
1.5.2.	Genes de Virulência para <i>Yersinia ruckeri</i>	12
1.6.	Mecanismos de patogenicidade bacteriana.....	12
1.7.	Transferência Horizontal de Genes.....	14
1.7.1.	Conjugação.....	15
1.7.2.	Transformação.....	15
1.7.3.	Transdução.....	16
1.8.	Técnicas de deteção de agentes patogénicos bacterianos.....	17
1.9.	Determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos.....	17
1.9.1.	Genes <i>qnr</i>	17
1.9.2.	Genes <i>mcr</i> associados à resistência à Colistina.....	18
1.9.3.	Genes <i>bla</i> associados à resistência a β -lactâmicos.....	19
1.10.	Objetivos.....	19
2.	Materiais e Métodos	20
2.1.	Estirpes microbianas e métodos de cultura.....	20

2.2.	Conservação de stocks	20
2.3.	Extração do DNA.....	20
2.4.	Pesquisa de genes de virulência.....	21
2.5.	Purificação de produtos de PCR e sequenciação e identificação de isolados.....	21
2.6.	Testes fenotípicos de virulência	22
2.7.	Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos	23
3.	Resultados e Discussão	25
3.1.	Testes de crescimento das estirpes estudadas.....	25
3.2.	Pesquisa de genes de virulência.....	27
3.3.	Testes fenotípicos de virulência	31
3.4.	Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos	36
4.	Conclusão	37
5.	Referências Bibliográficas.....	38
6.	Anexos	45
	Anexo 6.1. <i>Primers</i> utilizados para os testes de virulência com as condições de cada um destes	45
	Anexo 6.2. <i>Primers</i> utilizados para os testes de resistência com as condições de cada um destes	48
	Anexo 6.3. Sequência consenso do gene <i>toxR</i> para a estirpe <i>Vibrio alginolyticus</i> 12M CECT S21	50
	Anexo 6.4. Resultado da sequenciação do gene <i>luxR</i> para a estirpe <i>Vibrio alginolyticus</i> 12M CECT S21.....	50
	Anexo 6.5. Resultado da sequenciação do gene <i>luxR</i> para a estirpe <i>Vibrio harveyi</i> Vh 017/18 51	51
	Anexo 6.6. Resultado da sequenciação do gene <i>toxR</i> para a estirpe <i>Vibrio alginolyticus</i> 12M CECT S21 na bases de dados NCBI Blast.....	51
	Anexo 6.7. Resultado da sequenciação do gene <i>luxR</i> para a estirpe <i>Vibrio alginolyticus</i> 12M CECT S21 e comparação nas bases de dados	52
	Anexo 6.8. Resultado da sequenciação do gene <i>luxR</i> para a estirpe <i>Vibrio harveyi</i> Vh-017/18 e comparação nas bases de dados	52
	Anexo 6.9. Amplificação do gene <i>lux</i> para a estirpe <i>Vibrio harveyi</i> DSM 19623.....	53

Anexo 6.10. Amplificação do gene <i>tox</i> para as estirpes <i>Vibrio harveyi</i> Vh-017/18 e <i>Vibrio anguillarum</i> 10J Aqv55.....	53
---	----

Índice de figuras

Figura 1.1 - Produção aquícola mundial de animais aquáticos e algas desde 1990 a 2018.....	1
Figura 1.2 - Comparação da produção de aquacultura em Portugal nos anos 2017 e 2018, juntamente com o valor de vendas (DGRM, 2018).....	2
Figura 1.3 - Estrutura do volume de produção em aquicultura, por espécie (2017-2018) (DGRM, 2018).....	3
Figura 1.4 - Mecanismos de transferência genética em bactérias (Curtis e Schnek, 2000).....	16
Figura 3.1 - Exemplo de crescimento em TSA + 1%NaCl a 28°C da estirpe de <i>Vibrio anguillarum</i> 10J AQV 55.....	26
Figura 3.2 - Exemplo de crescimento em TCBS a 28°C da estirpe de <i>Vibrio alginolyticus</i> 12M CECT S21	26
Figura 3.3 - Amplificação do gene <i>lux</i>	29
Figura 3.4 - Amplificação do gene <i>tox</i>	30
Figura 3.5 - Exemplo da atividade proteolítica da estirpe de <i>Vibrio harveyi</i> Vh 017/16.	32
Figura 3.6 - Exemplo da atividade lipolítica por parte da estirpe de <i>Yersinia ruckeri</i> QSP 57.1	33
Figura 3.7 - Exemplo de formação de biofilmes da estirpe de <i>Vibrio harveyi</i> Vh 017/16 (tubo vermelho escuro) quando comprada com a estirpe <i>Vibrio harveyi</i> DSM 19623 (tubo vermelho).	34
Figura 3.8 - Exemplo da atividade de gelatinase por parte da estirpe de <i>Vibrio harveyi</i> DSM 19623.	35
Figura 3.9 - Exemplo da atividade hemolítica por parte da estirpe de <i>V. anguillarum</i> V10J AQV 55.....	35

Índice de tabelas

Tabela 3.2- Resultados de PCRs, pesquisa genes de virulência para as diferentes estirpes27

Tabela 3.3- Resultado dos testes fenotípicos realizados para cada uma das estirpes.32

Índice de abreviaturas

Blast - Basic Local Alignment Search Tool

BHIA - Brain Heart Infusion Agar

CBA - Agar de sangue columbia

DGRM - Direção Geral dos Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ERM- Doença entérica da boca vermelha

ESBLs - β -lactamases de largo espectro

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation

LAMP – Amplificação isotérmica de ácidos nucleicos

LB - Luria Bertani

MA- Agar de McConkey

NA - Agar nutritivo

NASBA – Amplificação baseada em sequências de ácidos nucleicos

NCBI - National Center for Biotechnology information

PCR – Polymerase Chain Reaction

TCBS - Agar tiosulfato citrato sacarose biliar

TSA - Agar Trípico de Soja

TSB - Caldo Trípico de Soja

1. Introdução

1.1. Aquacultura Mundial

A aquacultura tem crescido substancialmente nas últimas décadas desempenhando atualmente um papel de grande importância no sistema alimentar global (Young et al., 2019), sendo que esta apresentou em 2018 uma produção aquícola mundial de aproximadamente 114,5 milhões de toneladas (Figura 1) (FAO, 2020).

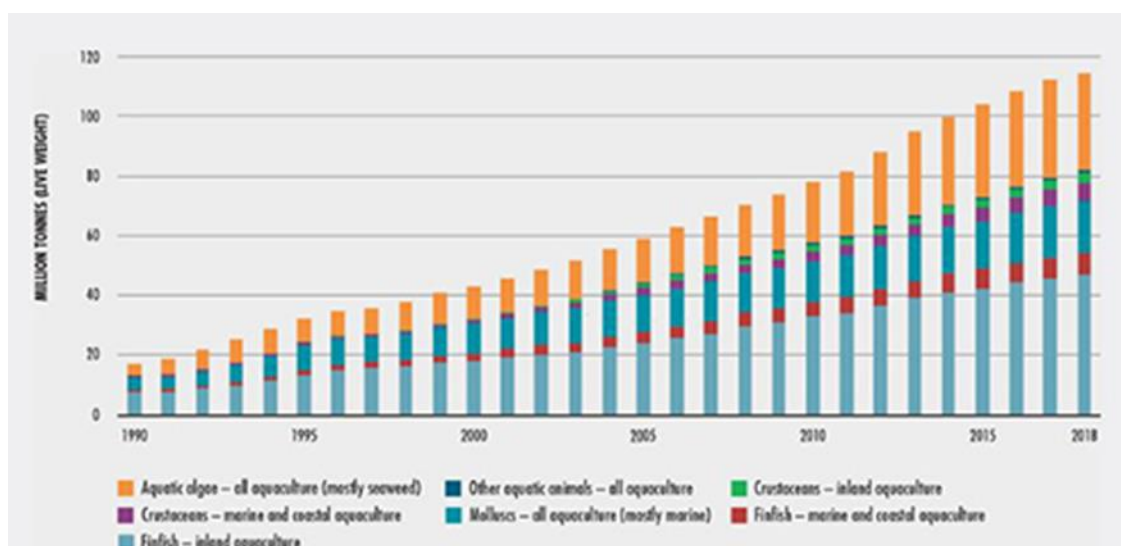


Figura 1.1 - Produção aquícola mundial de animais aquáticos e algas desde 1990 a 2018

A indústria da aquacultura é muitas vezes considerada como uma abordagem importante para o desenvolvimento de soluções para problemas relacionados com a sobrepesca, na medida em que a expansão desta pode reduzir as pressões sobre os stocks selvagens assim como na prevenção de habitats marinhos (Longo et al., 2019).

Uma das principais ameaças na área da aquacultura são as perdas económicas originadas por surtos de doenças infecciosas resultando na alta mortalidade nos cultivos. É de salientar que, um grupo reduzido de agentes patogénicos é responsável por grandes perdas económicas na aquacultura, sendo 58,0% patógenos bacterianos,

22,6% virais e 19,4% agentes parasitários os responsáveis por infeções em peixes (Dadar et al., 2017).

Compreender as condições que estão subjacentes à origem e à disseminação de doenças infecciosas é, portanto, um grande desafio para o desenvolvimento de uma indústria de aquacultura global sustentável. A origem de novos patógenos pode resultar da evolução de novas estirpes ou da expansão de patógenos, previamente caracterizados, a nível mundial (Bayliss et al., 2017).

1.2. Aquacultura em Portugal

A produção aquícola total em 2018 foi de 13 992 toneladas, resultado que traduz, face a 2017, um aumento de 11,5%. As vendas geraram uma receita de 96,8 milhões de euros, ou seja um acréscimo de 18,5% (81,7 milhões de euros em 2017), tendo as quantidades vendidas (11 768 toneladas) registado um aumento de 8,1%. O total das vendas representou 84% da produção nacional (87% em 2017) (Figura 1.2) (INE, 2020).

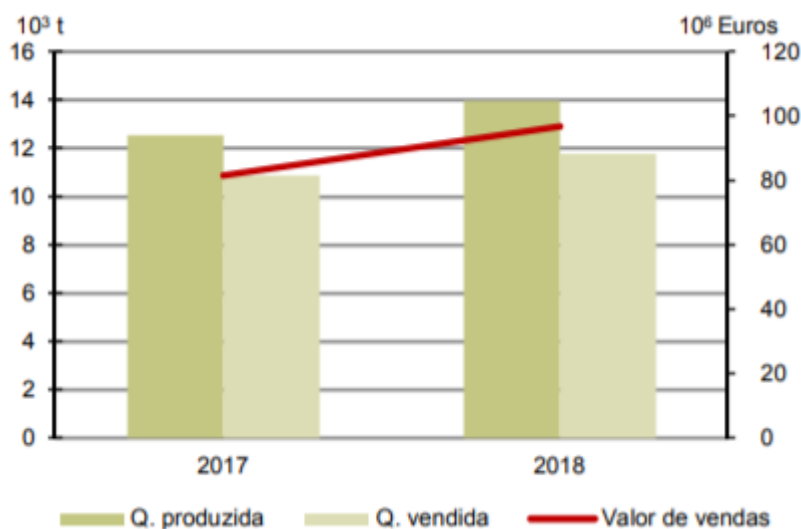


Figura 1.2- Comparação da produção de aquacultura em Portugal nos anos 2017 e 2018, juntamente com o valor de vendas (DGRM, 2018).

A produção em águas de transição e marinhas manteve-se predominante em 2018, correspondendo a 95,0% da produção total. A produção de peixes em águas de transição e marinhas (90,0% da qual foi constituída por pregado e dourada) representou

apenas 27,6% da produção total, contra 37,5% em 2017, tendo diminuído 18%. De facto, observaram-se decréscimos na produção das principais espécies: pregado (-5,9%) com 2 582 toneladas, dourada (-13,5%), com 898 toneladas e robalo (-71,5%), que não ultrapassou as 200 toneladas. Pelo contrário, a produção de moluscos e crustáceos aumentou 32,1% em 2018, tendo representado 67,2% da produção aquícola total, contra apenas 56,7% em 2017 (Figura 1.3). A maior produção, de moluscos bivalves, resultou da substituição da prática da piscicultura pela moluscicultura em zonas de transição (estuários e lagoas), bem como das maiores produções provenientes dos estabelecimentos localizados em mar aberto (INE, 2020).

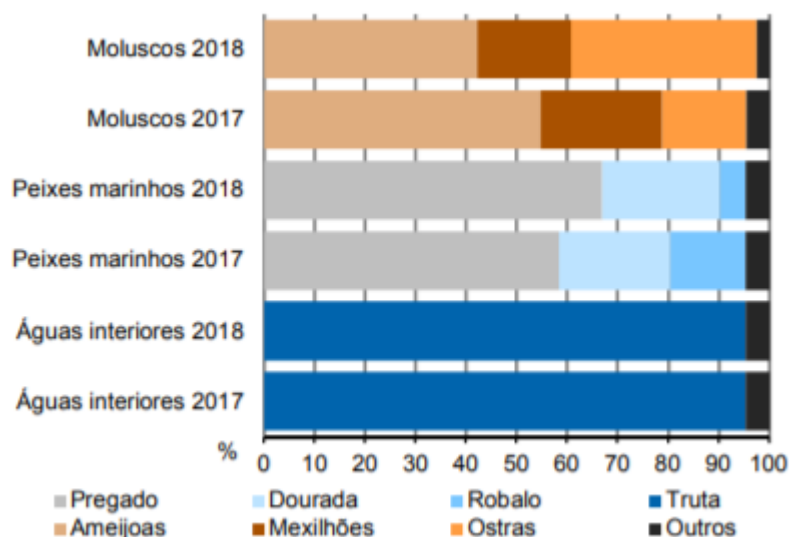


Figura 1.3- Estrutura do volume de produção em aquicultura, por espécie (2017-2018) (DGRM, 2018)

1.3. Doenças e bactérias patogénicas de peixes

Uma das principais ameaças na área da aquicultura são as perdas económicas originadas por surtos de doenças infecciosas resultando na alta mortalidade dos cultivos. É de salientar que, um grupo reduzido de agentes patogénicos é responsável por grandes perdas económicas na aquicultura, sendo 58,0% patógenos bacterianos, 22,6% virais e 19,4% agentes parasitários os responsáveis por infeções em peixes (Dadar et al., 2017).

Compreender as condições que estão subjacentes à origem e à disseminação de doenças infecciosas é, portanto, um grande desafio para o desenvolvimento de uma

indústria de aquacultura global sustentável. A origem de novos patógenos pode resultar da evolução de novas estirpes ou da expansão de patógenos, previamente caracterizados, a nível mundial (Bayliss et al., 2017) A vibriose e a yersiniose estão entre as doenças que mais afetam os peixes de aquacultura (Öztürk e Altınok., 2014).

1.3.1. Vibriose

A Vibriose é geralmente referida como uma infeção bacteriana sistémica causada por bactérias da família *Vibrionaceae*. É geralmente associada a peixes marinhos selvagens e de aquacultura, sendo considerada como um dos maiores problemas nas aquaculturas uma vez que causa perdas económicas significativas nesta indústria em todo o mundo (Mancuso et al., 2015).

A variação das propriedades físico-químicas da água e a densidade elevada de peixes estão entre as razões que levam a surtos de Vibriose em peixes de aquacultura (Kumar et al., 2015).

Vários estudos realizados para compreender mais sobre esta doença levam a progressos significativos na compreensão do agente causador e desenvolvimento desta doença. Apesar de grandes esforços a patogénese da Vibriose em grande parte permanece incerta (Austin e Austin, 2016).

Os sintomas associados a esta doença são a desorientação, letargia, perda de apetite e lesões oculares que posteriormente podem provocar exoftalmia (Xu et al., 2017).

1.3.2. Yersiniose

A yersiniose ou doença entérica da boca vermelha (ERM) é uma das patologias que mais afeta os salmonídeos e leva a grandes perdas económicas nas aquaculturas destes peixes em todo o mundo (Carson e Wilson, 2009). Esta doença é causada pela enterobactéria Gram-negativa *Yersinia ruckerii*. Este patógeno está distribuído geograficamente ao longo de todo o mundo especialmente em países que cultivam intensivamente peixes como o *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss*, *Anguilla anguilla*, *Carassius auratus*, *Perca fluviatilis*, *Solea solea*, *Acipenser baeri*, *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax* (Vadyvaloo e Lawrenz, 2019).

A ERM afeta peixes em todas as fases de desenvolvimento, mas é mais comum afetar peixes de fases de desenvolvimento inferiores como larval e juvenil, porém esta doença

aparece como uma condição tendencialmente crónica em peixes mais velhos/maiores cujo sistema imunitário já se encontra enfraquecido (Kumar et al., 2015). Os surtos de doenças começam com níveis de mortalidade baixos que vão aumentando ao longo do tempo, resultando em grandes perdas nos stocks (Kumar et al., 2015).

Podem ser observadas alterações no comportamento dos peixes, que incluem natação à superfície, movimentos letárgicos e perda de apetite. Outros sinais da doença incluem exoftalmia, escurecimento da pele e hemorragias subcutâneas dentro e em redor da boca e da garganta, que dão à doença o seu nome comum (doença entérica da boca vermelha) (Vadyvaloo e Lawrenz, 2019). Hemorragias petequiais podem ocorrer na superfície do fígado, pâncreas, bexiga natatória e nos músculos laterais. O baço fica dilatado (esplenomegalia) e apresenta uma coloração preta, os intestinos podem ficar avermelhados e preenchidos com um fluido amarelado (Carson e Wilson, 2009).

Exames histopatológicos mostram uma septicémia geral com uma inflamação na maioria dos órgãos, em particular no rim, baço, fígado, coração, brânquias e em áreas com hemorragia petequial. Foram descritas mudanças patológicas nas brânquias, incluindo hiperemia e edema (Kumar et al., 2015).

1.4. Género *Vibrio*

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), apresentam variação sazonal nos níveis populacionais e estão amplamente distribuídas tanto em habitats estuarinos como marinhos (Damir et al., 2013; Wei et al., 2014).

A maior parte destas bactérias são patogénicas para animais marinhos, como camarões, moluscos e peixes ósseos (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) (Austin e Austin, 2016).

No que diz respeito à temperatura e salinidade, sabe-se que temperaturas e salinidades mais elevadas despoletam um rápido crescimento em muitas espécies de *Vibrio sp.*

(Baker-Austin et al., 2018). Porém, espécies como *Aliivibrio salmonicida* anteriormente classificado como *Vibrio salmonicida* possui uma temperatura ótima de crescimento baixa de 15°C (Magarinos, 2017). Sabe-se também que os surtos de Vibriose apenas surgem quando a temperatura da água excede os 15°C (Baker-Austin et al., 2018).

O aquecimento global afeta também a qualidade da água, densidade populacional e presença de microrganismos contribuindo para o aumento deste género de bactérias patogénicas (Frans et al., 2011; Damir et al., 2013; Wei et al., 2014).

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 (Baker-Austin et al., 2018).

1.4.1. *Vibrio harveyi*

Vibrio harveyi é considerado um agente patogénico clássico dos peixes, mas muitos consideraram esta espécie como um organismo oportunista. Também foi relatado que afeta peixes como *Rachycentron canadum*, *Trachurus japonicus*, *Paralichthys dentatus*, *Sciaenops ocellatus*, *Solea senegalensis*, *Centropomus undecimalis*, *Chanos chanos*, *Mola mola* e *Sparus aurata* (Mohamad et al., 2019).

Nos animais infetados, este agente patogénico encontra-se essencialmente em elevada concentração no sangue, rim, baço, pele e fígado, podendo originar frequentemente, fígados hemorrágicos (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, atualmente, apresentam resistência (Loureiro et al., 2016). Para além disto, também tem sido registado nos últimos anos o surgimento de resistências a antimicrobianos em *V. harveyi*, devido ao uso excessivo destes compostos para prevenir doenças bacterianas em sistemas de aquacultura (Lal et al., 2017).

Para agravar esta situação, o mecanismo causador de doença, por *V. harveyi* ainda não é conhecido e não está disponível nenhum método 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 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 imunostimulação e utilização de peptídeos antimicrobianos, entre outras (Austin e Austin, 2016). Tem-se assistido a um crescente investimento da investigação nesta área (Frans et al., 2011; Sorroza et al., 2012; Mohamad et al., 2019). Em relação às estratégias de controlo utilizadas para combater este tipo de microrganismos, salienta-se a vacinação e a quimioterapia (Sorroza et al., 2012).

1.4.2. *Vibrio anguillarum*

Vibrio anguillarum, infeta mais de 50 espécies de peixes em países temperados. Por esta razão, é a espécie mais caracterizada do género e tem sido extensivamente revista (Hickey e Lee, 2017). Além disso, *V. anguillarum* tem sido usualmente usado como um microrganismo modelo para estudar a patogenicidade da Vibriose em peixes (Mohamad et al., 2019).

É uma bactéria que cresce rapidamente em temperaturas entre os 25°C e os 30°C, em meios com 1,5-2,0% de cloreto de sódio (Baker-Austin et al., 2018). Este *Vibrio* pode provocar doença assintomática, ou seja, sem manifestações visíveis, ou então poderá ocorrer na forma de septicemia hemorrágica letal para os organismos sensíveis (Hickey et al., 2015).

Os peixes expostos a este *Vibrio* sofrem elevada mortalidade, provocando uma hemorragia severa, formação de úlceras e furúnculos na pele, eritemas e anemia (Hickey et al., 2015). Para além disto, este microrganismo tem a capacidade de apresentar vários mecanismos de patogenicidade, conseguindo penetrar na pele dos organismos, que causam danos na pele, ficando assim essa barreira danificada podendo ser encontrada muitas vezes em altas concentrações no sangue e tecido hematopoiéticos (Austin e Austin, 2016).

Embora as vacinas já desenvolvidas contra este patógeno estejam disponíveis para os peixes e sejam eficazes, a vacinação não é uma opção viável para as larvas de peixe, uma vez que estamos a lidar com um grande número destes pequenos organismos. Devem ser desenvolvidas estratégias alternativas para controlar as doenças dos peixes na aquicultura como por exemplo o uso de bacteriófagos como terapia é uma abordagem alternativa e eficaz para prevenir e controlar bactérias patogénicas na

aquacultura como é o caso do *Vibrio anguillarum*, em que estes bacteriófagos são inseridos no alimento dado às larvas de peixe (Silva et al., 2014).

1.4.3. *Vibrio alginolyticus*

O *Vibrio alginolyticus* é o único de entre as três espécies de *Vibrio* referidas que é reconhecida como um agente patogénico humano, provocando infeções gastrointestinais, tendo sido identificado em surtos relacionados com a ingestão de água e marisco (Damir et al., 2013).

Os casos de infeções por *V. alginolyticus* têm sido associados a uma elevada mortalidade em larvas de vários moluscos bivalves e em peixes marinhos de aquacultura foram inicialmente relatados em países mediterrânicos. Estes incluíam a dourada e o robalo na Tunísia, em Espanha e Israel (Rameshkumar et al., 2017). Mais tarde, foram relatadas incidências de Vibriose envolvendo *V. alginolyticus* em países asiáticos e a aquacultura de *Rachycentron canadum* particularmente na Índia e em Taiwan, eram frequentemente afetadas (Mohamad et al., 2019)

Os estudos mostram que *V. 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: septicémia, hemorrágica, pele escura e úlceras na superfície da pele e em alguns casos, a sintomatologia é muito idêntico à provocada pelo *V. anguillarum*. Internamente, o peixe acumula fluído na cavidade peritoneal e, em alguns casos, surgem fígados hemorrágicos. 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 conseqüentemente de peso, letargia e lesões na superfície do corpo que podem ulcerar (Baker-Austin et al., 2018).

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 (Austin e Austin, 2016).

1.4.4. Detecção fenotípica de espécies da família *Vibrionaceae*

As várias espécies de *Vibrio* são conhecidos por serem fenotipicamente heterogêneas que muitas vezes contribuem para novas características fenotípicas e este fator contribui para obstáculos na identificação precisa do agente patogénico utilizando testes bioquímicos e fisiológicos. Além disso, a abordagem convencional não é capaz de diferenciar o patogénico das espécies não patogénicas (Munro et al., 2003).

Geralmente espécies da família *Vibrionaceae* são isoladas 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 e Lee, 2014). Para além disso, sabe-se que a identificação precisa de diferentes espécies do género *Vibrio* é problemática, principalmente quando se trata de espécies aparentadas, nomeadamente devido à variabilidade das características bioquímicas, o que complica então a identificação fenotípica destas bactérias (Austin e Austin, 2016).

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) têm sido cada vez mais utilizadas na deteção de agentes patogénicos (Hickey et al., 2015).

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 semelhante, porém cerca de 100 vezes mais sensível, para além de permitir a quantificação das cópias de DNA presentes na amostra em estudo (Kim e Lee, 2014), mas tem um custo elevado e a sua implementação na prática real de uma aquacultura revela-se difícil.

1.4.5. Testes fenotípicos para *Vibrio*

O diagnóstico definitivo da Vibriose requer a identificação das bactérias nos tecidos-alvo com sinais clínicos comprovativos desta doença. Os órgãos que são utilizados para o

isolamento da infecção sistêmica são o rim, o fígado e o baço, enquanto o isolamento das lesões cutâneas é uma opção quando as ulcerações estão presentes. Para esta identificação utiliza-se agares seletivos como o agar TCBS, já referido anteriormente, que é o meio habitualmente utilizado no isolamento de *Vibrio*, especialmente em amostras ambientais *Vibrio* (Froelich et al., 2014).

1.4.6. Genes de Virulência para *Vibrio*

Existem genes de virulência que muitas vezes são encontrados em estirpes do gênero *Vibrio* como por exemplo *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* (Rivera et al., 2001). O gene *ctxA* (subunidade A da toxina colérica), provoca o aumento da síntese de cAMP em células epiteliais intestinais, levando à saída de íons de cloreto, água e sódio das células epiteliais do intestino levando posteriormente à perda de peso e enfraquecimento do organismo do hospedeiro contribuindo para a letalidade deste (Guichard et al., 2013).

O gene *ompU* (proteína da membrana externa) também é importante para a patogenicidade da bactéria uma vez que forma poros que permitem a difusão passiva de pequenas moléculas através da membrana externa. Já o gene *zot* (toxina da zonula ocludens) aumenta a permeabilidade do muco do intestino, afetando a estrutura das junções intercelulares (UniProt, 2021).

tcpA (precursor da subunidade de pilina coregulado por toxinas TcpA) é um gene que tem como componente principal o *pilus* coregulado da toxina tcp que é um *pilus* essencial para a agregação bacteriana e posteriormente para a colonização no intestino hospedeiro (Lime et al., 2010)

tcpl (proteína quimiotaxis metil aceitador, relacionado com TcpI) é considerado um gene de virulência importante para a bactéria uma vez que tem a atividade de inibição da transcrição celular podendo estar na origem de tumores no hospedeiro (Zuo et al., 2014)

O gene *hlyA* (hemolisina) é dos genes mais importantes no que toca à virulência das bactérias uma vez que provoca a hemólise, causando assim a destruição dos glóbulos vermelhos do hospedeiro contribuindo para a letalidade deste (Olson e Gouaux., 2005).

stn/sto (enterotoxina termo-estável) é uma toxina que afeta o intestino do hospedeiro possuindo uma grande resistência a variações de temperatura, levando à degradação do intestino do hospedeiro e posteriormente à sua letalidade (UniProt, 2021).

O passo fundamental para o desenvolvimento de uma identificação de um gene de virulência é a descoberta de um gene-alvo ou de um biomarcador molecular. Genes específicos para *V. harveyi* como por exemplo *luxR* (Proteína transcriptional reguladora *LuxR*) que é responsável por modular a expressão de fatores de virulência, formação de biofilme e respostas imunes hospedeiras (Guan et al., 2019).

vhh (*V. harveyi* hemólise) provoca a hemólise celular em que as exotoxinas afetam as membranas das células sanguíneas do hospedeiro causando a ruptura celular assim como a *vvh* (hemólise). Estes genes foram descritos como sendo genes de virulência que contribuem para a patogenicidade do *V. harveyi* (Xu et al., 2017).

Existem vários genes de virulência importantes que contribuem para a virulência dos agentes patogênicos, tais como a proteína da membrana externa (*omp*). Acredita-se que este gene desempenha papéis importantes na infecção e patogenicidade para o hospedeiro e a expressão deste gene é controlada pelo gene *toxR* (ativador transcriptional *toxR*) Este ativador de transcrição controla a toxina da cólera que pode estar presente no *Vibrio alginolyticus* e no *Vibrio anguillarum*. *ompK* (proteína da membrana externa k) serve como recetor para bacteriófagos (UniProt, 2021)

Outros genes de virulência como o *tlh* (hemolisina termolábil) que provoca a ruptura celular de células sanguíneas ou o *vpi* (Ilha de patogenicidade de *V. cholerae*) que provoca a destruição de células do intestino e enfraquecimento do organismo contribuem para a virulência do *Vibrio alginolyticus* (Xie et al., 2005).

1.5. *Yersinia ruckeri*

A *Yersinia ruckeri* pertence à família *Yersiniaceae* e é descrita como uma bactéria Gram-negativa em forma de haste (Wrobel et al., 2019). As células deste microrganismo podem sobreviver em ambientes anaeróbicos e aeróbicos e são geralmente uniformes em termos de morfologia. Estas células apresentam uma forma arredondada, com 0,75 µm de diâmetro e 1-3 µm de comprimento, embora existam diferenças no tamanho das células e na sua morfologia celular (Adeolu et al., 2016). *Y. ruckeri* não forma esporos ou cápsula. Algumas estirpes de *Y. ruckeri* são flageladas e, conseqüentemente, apresentam mobilidade (Wrobel et al., 2019).

Foram descritos dois biótipos diferentes desta bactéria com base na ausência ou na presença de flagelo. O primeiro biótipo é móvel e apresenta atividade lipolítica

enquanto que o segundo biótipo não é móvel e não apresenta capacidade lipolítica (Moreau et al., 2019).

O segundo biótipo é causada por mutações no aparelho de secreção flagelar. *Y. ruckeri* pode ser encontrada nos órgãos internos de peixes infetados, e pode ser cultivada em vários meios bacteriológicos, como Agar Tríptico de Soja (TSA), Agar nutritivo (NA), brain heart infusion agar (BHIA), Agar de sangue columbia (CBA) Agar de McConkey (MA) (Tobback et al., 2007). Após 24-48 h de incubação, a bactéria forma colônias lisas, circulares e brilhantes (Moreau et al., 2019). As células crescem rapidamente numa ampla faixa de temperatura de 22 °C a 37 °C. A *Y. ruckeri* pode ser identificada por meio de testes de diagnóstico serológico e molecular (Moreau et al., 2019).

1.5.1. Testes fenotípicos para *Yersinia ruckeri*

O diagnóstico definitivo da yersiniose requer a identificação das bactérias nos tecidos-alvo como rim, o fígado e o baço, posteriormente, os testes fenotípicos que principalmente se utilizam servem para estudar a motilidade, hemolisina, lipase, oxidase, catalase, fermentação de glicose em meios aeróbicos e anaeróbicos (Duman et al., 2018). O crescimento em meio Luria-Bertani (LB) adicionando 5% de sangue de ovelha serve para estudar a capacidade hemolítica, a motilidade pode ser confirmada por um teste de manitol utilizando o Nitrato de Motilidade Manitol (BioRad) (Calvéz et al., 2014) a atividade lipolítica pode ser testada pela hidrólise de Tween 80 em meio Schotts Waltman agar (Hossain et al., 2020).

1.5.2. Genes de Virulência para *Yersinia ruckeri*

Genes de virulência da *Y. ruckeri* como *yyp1* (*Y. ruckeri* Protease 1) capaz de provocar uma resposta proteolítica por parte da bactéria e *hlyA* (hemolisina) foram descritos como genes de virulência que contribuem para a patogenicidade da bactéria (Eissa et al., 2008).

1.6. Mecanismos de patogenicidade bacteriana

Recentemente, surgiram evidências significativas que indicam que os patógenos microbianos significativamente diferentes usam estratégias comuns para causar

infecções e doenças. Por exemplo, diversos patógenos bacterianos partilham mecanismos comuns em termos das suas capacidades para aderir, invadir e causar danos nas células e tecidos dos hospedeiros, bem como para sobreviver às defesas do hospedeiro e estabelecer uma infeção. (Wilson et al., 2002).

A relação entre um hospedeiro e um agente patogénico é dinâmica, uma vez que cada um modifica as atividades e funções do outro. O resultado de tal relação depende da virulência do agente patogénico e do grau relativo de resistência ou suscetibilidade do hospedeiro, devido principalmente à eficácia dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Todar, 2020).

Os agentes patogénicos bacterianos devem ser capazes de se ligar às células hospedeiras ou ao tecido. A adesão pode envolver camadas de polissacarídeo produzidas pelas bactérias, como uma camada de cápsula ou o muco bacteriano, que fornecem aderência às células hospedeiras, bem como a resistência da fagocitose. A adesão também pode ser realizada por estruturas físicas como um *pilus* ou flagelo. (Bruslind, 2021). Uma vez "aderido" a uma superfície específica da célula hospedeira, o patógeno é então capaz de iniciar os seus processos bioquímicos específicos que resultarão em doenças, incluindo proliferação, secreção de toxinas, invasão de células hospedeiras e ativação da sinalização de células hospedeiras (Wilson et al., 2002).

A invasão refere-se à capacidade do agente patogénico de se espalhar para outros locais do hospedeiro, invadindo células hospedeiras ou tecidos. Esta colonização é importante para a sobrevivência patogénica e invasão a outros locais, o que dará mais nutrientes e espaço para a população em crescimento (Bruslind, 2021).

É tipicamente neste ponto em que a doença ou sinais/sintomas óbvios da doença ocorrem. Embora as estruturas físicas ainda possam desempenhar um papel na invasão, a maioria dos agentes patogénicos bacterianos produzem uma grande variedade de químicos, especificamente enzimas que afetam as células e tecidos do hospedeiro. Enzimas como a colagenase, que permite que o agente patogénico se espalhe decompondo o colagénio encontrado no tecido conjuntivo. Ou leucocidinas, que destroem os glóbulos brancos do hospedeiro, diminuindo a resistência. As hemólises lisam os glóbulos vermelhos do hospedeiro, libertando ferro, um fator de limitação do crescimento para as bactérias. (Bruslind, 2021).

A parede celular de bactérias Gram positivas e Gram negativas contém componentes tóxicos que são fatores de virulência potentes e têm papéis centrais na patogénese do

choque séptico bacteriano, uma condição que é frequentemente letal que envolve o colapso do sistema circulatório e pode originar falência do sistema de múltiplos órgãos. Ironicamente, os antibióticos usados no tratamento destas estirpes microbianas podem libertar grandes quantidades de componentes tóxicos da parede celular bacteriana e, assim, impedir o tratamento e desta maneira influenciar negativamente o resultado final para o hospedeiro (Wilson et al., 2002).

Toxigênese é a capacidade de produzir toxinas. As bactérias podem produzir dois tipos de toxinas chamadas exotoxinas e endotoxinas (Bruslind, 2021). As exotoxinas são libertadas das células bacterianas e podem atuar em locais de tecido afastados do local de crescimento bacteriano. As endotoxinas são substância associada às células. No entanto, as endotoxinas podem ser libertadas no o cultivo de células bacterianas e células que são lisadas como resultado de uma defesa eficaz do hospedeiro (por exemplo, lisozima) ou das atividades de certos antibióticos (por exemplo, penicilinas e cefalosporinas). Assim, as toxinas bacterianas, podem ser transportadas por sangue e linfa e causar efeitos citotóxicos em locais de tecidos afastados do ponto original de invasão ou crescimento. Algumas toxinas bacterianas também podem atuar no local de colonização e desempenhar um papel na invasão (Todar, 2020).

A cápsula protege as bactérias de fenômenos de fagocitose uma vez que não permite que os anticorpos sejam reconhecidos pelas células de defesa do hospedeiro (por exemplo, macrófagos e neutrófilos). Esta "fagocitose interrompida" leva a uma maior resposta inflamatória à medida que os macrófagos e neutrófilos produzem citocinas mais inflamatórias na tentativa de combater as bactérias (Wilson et al., 2002).

1.7. Transferência Horizontal de Genes

A transferência horizontal de genes pode ser definida como a troca de material entre organismos vizinhos que pode ocorrer entre seres unicelulares e multicelulares, sem que sejam descendentes, ou seja, não ocorre da bactéria progenitora para os descendentes (Sun, 2018).

Os processos de transporte horizontal de genes (HGT) foram detetados originalmente há cerca de 70 anos (Yang et al., 2019). Durante as últimas duas décadas, conjugação, transformação e transdução foram identificados em muitas espécies bacterianas numa

variedade de habitats que vão desde os solos, a biofilmes e ao trato gastrointestinal (Villa et al., 2019).

Existem três mecanismos de transferência horizontal de genes em bactérias: transformação, transdução e conjugação. O mecanismo mais comum para a transmissão horizontal de genes entre bactérias, é a conjugação. Embora as bactérias possam adquirir novos genes através da transformação e transdução, estas são geralmente formas de transferência mais raras entre bactérias da mesma espécie ou espécies intimamente relacionadas (Describe, 2010).

1.7.1. Conjugação

Na conjugação, a transferência de genes é mediada através de um contacto celular entre células dadoras e receptoras que necessitam estar no mesmo ambiente para permitir a ocorrência desta conjugação entre as células. (Yang et al., 2019). O fator de fertilidade, localizado num plasmídeo que fornece às bactérias a capacidade de originar um *pilus* sexual através do qual o material genético pode ser passado para bactérias que não possuem o *pilus*. Algumas bactérias podem ter esta capacidade o que lhes permite transferir todo o seu material genético, porém este material é de curta durabilidade e as bactérias recetoras nem sempre adquirem o material genético de forma total (Figura 1.4) (Martínez, 2019).

1.7.2. Transformação

Muitas espécies bacterianas são transformadas naturalmente, ou seja, têm a capacidade natural de obter o DNA do meio ambiente. Estas estirpes que são naturalmente transformáveis existem em diferentes nichos e possuem muitas características diferentes. O tamanho do DNA associado à célula é importante, sendo que um DNA com um alto peso molecular é mais eficaz no que toca à transformação (Daubin e Szöllösi, 2016). O DNA pode ser modificado por enzimas de restrição que são originadas por uma fonte geneticamente distante do organismo recetor. A integração do DNA ocorre por recombinação homóloga, ou seja a recombinação ocorre entre quaisquer duas sequências de DNA que sejam iguais ou muito semelhantes, quanto maior for a diferença das sequências, menor será a frequência de eventos por recombinação homóloga (Figura 1.4) (Yang et al., 2019).

1.7.3. Transdução

A transdução é um processo que está fortemente relacionado com os ciclos virais de bacteriófagos (vírus que infetam bactérias), capazes de introduzir material genético em bactérias diretamente no cromossoma bacteriano (Figura 1.4), para finalmente se replicar com a maquinaria celular e gerar novos vírus (Baker-Austin et al., 2018). Os bacteriófagos são conhecidos como mediadores de genes ambientais e também desempenham um papel integral na evolução dos patógenos (Yang et al., 2019), gerando uma mutação genética evolutiva que pode aumentar a capacidade de resistência a antimicrobianos da bactéria recetora (Jiang et al., 2013).

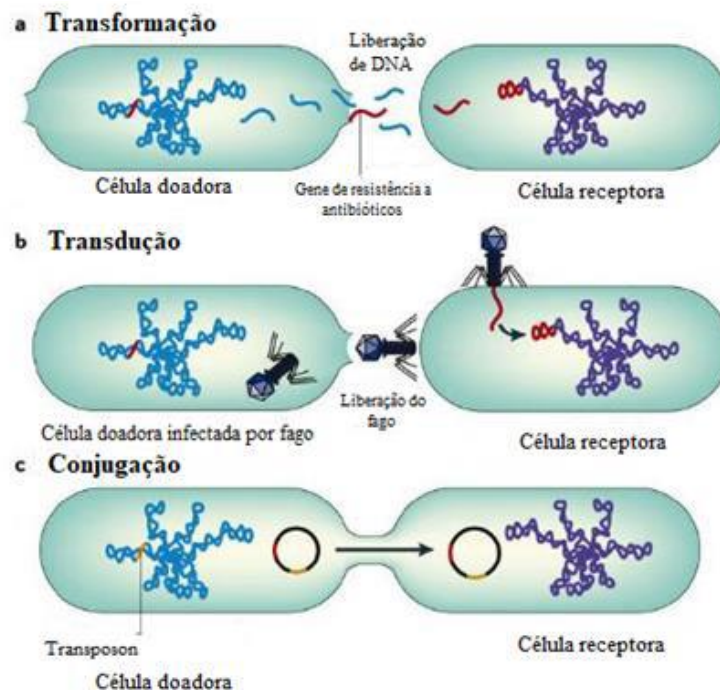


Figura 1.4 - Mecanismos de transferência genética em bactérias (Curtis e Schnek, 2000).

1.8. Técnicas de detecção de agentes patogénicos bacterianos

Muitos dos patógenos de peixes 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., 2011). Para além disto, também têm sido utilizados testes bioquímicos, homologia do DNA 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 (Altinok et al., 2011).

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, 2011).

1.9. Determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos

1.9.1. Genes *qnr*

Os *qnr* são genes móveis que codificam proteínas chamadas QNR que pertencem à família dos pentapéptidos repetidos, nesta família foram descritos 90 membros, dois deles com interesse em relação à resistência às quinolonas, o primeiro deles conhecido como McbG está presente em bactérias que sintetizam microcina e os protege de sua

inibição (Rodríguez, 2005). E o segundo gene conhecido como MfpA, capaz de interferir na ligação das fluoroquinolonas com o complexo DNA girase (Karl e Perlin, 2011), o seu mecanismo de ação baseia-se na ligação às enzimas girase e topoisomerase IV, protegendo-as da ação das quinolonas (Salah et al., 2019).

Foram identificadas cinco famílias: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS*; sendo que existem alguns casos de combinação com outros genes dentro do mesmo plasmídeo, gerando resistências cruzada entre quinolonas e outros antimicrobianos (Liu et al., 2016). Além dos 5 conhecidos membros da família *qnr* em 2008, foi relatado um novo membro *qnrVC* descrito em *Vibrio cholerae* (Rincón et al., 2014). Desde esse momento até o presente, sete alelos *qnrVC* (*qnrVC1* a *qnrVC7*) foram relatados na família *Vibrionaceae* (Carroll et al., 2019).

Os genes *qnr* têm sido descritos em várias bactérias presentes em ambientes marinhos nomeadamente *Vibrio splendidus*, e outras bactérias, que foram relatadas como fontes primárias destes genes. Estas bactérias podem ser encontradas em peixes e por isso podem ser potencialmente patogênicas (Shen et al., 2018).

1.9.2. Genes *mcr* associados à resistência à Colistina

A colistina é um polipeptídeo cíclico que pertence ao grupo das polimixinas, que possui propriedades surfactantes capazes de alterar a permeabilidade da parede de bactérias gram-negativas sensíveis, que possuem uma camada externa formada por lipopolissacarídeos (Álvarez et al., 2017).

A maioria das variações dos genes *mcr* descritas teve origem em animais ou humanos, no entanto existem algumas bactérias presentes em fontes de água que podem ter genes dessa família, o que pode sugerir funções de defesa contra bacteriófagos ou peptídeos antimicrobianos (Khedher et al., 2020).

Existem vários relatos dos genes *mcr* em ambientes aquáticos em todo o mundo: Espanha Portugal, China, Japão, América do Norte, Brasil e África Oriental (Dahanayake et al., 2019) e foram descritos já para várias espécies de moluscos (Sun, 2018).

1.9.3. Genes *bla* associados à resistência a β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos possuem uma estrutura chamada anel β -lactâmico, que consiste num anel heterocíclico de quatro átomos, três de carbono e um de azoto. Essa estrutura é capaz de bloquear a transpeptidação do peptidoglicano e pode ativar a lisina bacteriana endógena capaz de destruir o peptidoglicano, componente essencial da parede celular (Fresnadillo et al., 2015).

As β -lactamases de largo espectro (ESBLs) são a principal causa de resistência em que os genes da família *bla* são responsáveis por essa atividade (Blakely, 2014).

Os genes *bla* são capazes de produzir β -lactamases, que inibem os antimicrobianos β -lactâmicos em vários níveis, sendo os três principais tipos associados a essa atividade o, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} (Daubin & Szöllösi, 2016).

Os genes de resistência a β -lactâmicos têm sido relatados em ambientes marinhos praticamente em todo o mundo (Garcia et al., 2014).

Estes genes são encontrados principalmente em bactérias da família *Vibrionaceae* e existem relatos de membros do género *Vibrio* patógenos de peixes com presença de genes de resistência a β -lactâmicos na China, Espanha e França (Dahanayake et al., 2019).

1.10. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é estudar características fenotípicas e genes de virulência assim como genes de resistência de diferentes estirpes de bactérias ictiopatógenicas,

2. Materiais e Métodos

2.1. Estirpes microbianas e métodos de cultura

Foram estudadas seis estirpes ictiopatógenicas: *Vibrio alginolyticus* 12M CECTS21, *Vibrio anguillarum* 10J AQV 55, *Vibrio harveyi* Vh-017/18, *Vibrio harveyi* DSM 19623, *Yersinia ruckeri* QSP 57.1 e *Yersinia ruckeri* DSM 18506. Para o crescimento das estirpes em meio líquido usou-se Caldo Tríplico de Soja (TSB) com NaCl 1% adicionado, com um tempo de incubação de 24 a 48 horas, a 28°C e a 37°C. O crescimento em meio sólido foi realizado em TCBS para o crescimento das estirpes de *Vibrio* e TSA com NaCl 1% adicionado para o crescimento das restantes com incubação de 48 horas a 28°C e a 37°C. O manuseamento das estirpes correu sempre em condições de assepsia. O objetivo destes procedimentos foi verificar o crescimento das estirpes nos diferentes meios e a diferentes temperaturas estabelecendo as melhores condições de crescimento para as estirpes em estudo.

2.2. Conservação de stocks

A conservação dos stocks das estirpes foi realizada através da mistura de uma suspensão bacteriana com glicerol estéril em concentração final a 30%. De seguida estes microtubos foram homogeneizados e colocados numa arca a -80°C.

2.3. Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método de *boiling*. Cerca de 500 µl de suspensão bacteriana, no início da sua fase exponencial, foi centrifugado durante 5 min a 10 000 rpm (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, arplus). Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* 100 µl de água miliQ estéril, onde se resuspenderam as células bacterianas, seguindo-se aquecimento, num TermoBloco digital (Digital Heatblock, VWR), a 95°C durante 10 min. Procedeu-se a centrifugação, 5 min a 10 000 rpm e recolheu-se o sobrenadante que foi conservado a -20°C até utilização.

2.4. Pesquisa de genes de virulência

A presença de genes de virulência foi realizada para um total de 17 genes de virulência específicos de ictiobactérias (*ctxA*, *ompU*, *zot*, *tcpA(ToxR)*, *tcpA (El Tor)*, *tcpl*, *hlyA*, *hlyA (El Tor)*, *stn/sto*, *luxR*, *vhh,vvh*, *yrp1*, *ompK*, *tlh*, *VPI*, *toxR*). Todas as sequências estão indicadas no Anexo 6.1.

A pesquisa dos genes de virulência foi realizada por PCR com as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, emparelhamento entre 50 e 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 15 a 45 segundos e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Os *primers* utilizados e as respectivas condições de PCR estão listadas no Anexo 6.1. As reações de PCR foram realizadas num volume final de 50 µl, tendo-se usado 25 µL de *taq* polimerase (NZTTaqII 2x colourless Master Mix (Nzytech), de acordo com as instruções do fabricante, 0.25 µM de *primer forward e reverse*, 5 µL de DNA e água miliQ estéril na quantidade suficiente para perfazer o volume final.

Todos as reações foram realizadas num termociclador da marca Bio Rad, T100 Thermal Cycler.

Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1% a 80 V/h, e os géis foram observados num sistema de aquisição de imagem Gel DOC EZ Imager (Bio Rad).

2.5. Purificação de produtos de PCR e sequenciação e identificação de isolados

Os produtos de PCR foram purificados através de um kit de extração da marca GeneJET PCR da Thermo Scientific, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

A concentração de DNA presente foi medida num espectrofotómetro de micro-volume UV-Vis (Thermo Scientific, Nanodrop 2000), os tubos foram preparados na concentração de DNA necessária de acordo com os parâmetros exigidos pela empresa

responsável pela sequenciação (StabVida, Costa da Caparica), de 10 ng/μL; num volume de 10 μL ao qual foi adicionado 3 μL de *primers*. Os produtos de PCR foram sequenciados com o *primer forward e reverse*.

Das sequências obtidas geraram-se sequências consenso que foram analisadas através da base de dados National Center for Biotechnology information (NCBI) através da ferramenta bioinformática Basic Local Alignment Search Tool (Blast) em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. As sequências obtidas e comparação com a base de dados estão presentes nos Anexos 6.3 a 6.8.

2.6. Testes fenotípicos de virulência

Foram realizados seis testes fenotípicos relacionados com a virulência dos microrganismos: oxidase, proteolítico, gelatinase, lipolítico, formação de biofilmes e hemolisina. Todos os testes foram realizados em duplicado.

O teste proteolítico foi realizado em meio sólido com 1% de agar com 1,5% de leite desnatado e 1% de NaCl seguindo o protocolo de Ottaviani et al., (2009). As estirpes foram inoculadas e foram mantidas durante 48h numa estufa a 28°C. Após as 48h foram observadas as placas para verificar se as estirpes apresentavam a capacidade proteolítica, isto é, se havia aparecimento, de um halo, em torno da zona de crescimento das estirpes.

Para o teste da gelatinase foram preparados tubos com meio de cultura contendo gelatina onde se colocou dentro destes tubos um meio com 3,6g de gelatina, 1,5g de peptona e 0,9g de extrato de carne, segundo o protocolo de Pokhrel (2015). As estirpes foram depois inoculadas com o auxílio de uma ansa nos tubos. Os tubos foram incubados juntamente com um meio não inoculado a 28°C, até 2 semanas. Os tubos foram retirados diariamente da estufa e colocados em gelo durante 15-30 minutos para verificar a ocorrência da liquefação da gelatina. A gelatina liquefaz a uma temperatura superior a 28°C e para confirmar que a liquefação se deveu à atividade gelatinase, os tubos são imersos num banho de gelo. Estes tubos foram inclinados para observar se a gelatina foi hidrolisada seguindo o protocolo de Tankeshwar (2014) em que se houvesse presença de um líquido, ou seja, gelatina hidrolisada este resultado seria positivo, porém, se não houvesse presença de líquido dentro do tubo significaria que a gelatina não teria sido hidrolisada e por isso o resultado seria negativo.

O teste lipolítico foi realizado em meio, TSA com 1% NaCl e 1% Tween 80 seguindo o protocolo de Hossain et al., (2020). As estirpes foram inoculadas no centro da placa, fazendo um pequeno círculo e posteriormente foram mantidas durante 24h numa estufa a 28°C de acordo com o protocolo. Após as 24h foram observadas as placas para verificar se as estirpes apresentavam a capacidade lipolítica. Um teste lipolítico positivo é observado pelo aparecimento de um brilho iridescente à volta das colónias.

Para verificar a formação de biofilmes foi realizado um meio líquido de TSB com 1% de NaCl suplementado com 5% sucrose e 0,08% de vermelho do Congo seguindo o protocolo de Lee et al., (2016). As estirpes foram inoculadas nos tubos de 10 mL e posteriormente foram mantidos durante 48h numa estufa a 30°C. Após as 48h foram observados os tubos para verificar se as estirpes apresentavam a capacidade de formação de biofilmes, sendo que, quando apresentaram um escurecimento da cor (vermelho escuro ou preto) nos tubos de ensaio foram considerados testes positivos.

No teste da hemolisina inicialmente lavou-se 3 mL de sangue de dourada, com tampão fosfato concentrado 1x com um pH a 7,2, através de centrifugação (1000 rpm, 5 min, 4°C) o sangue posteriormente foi lavado mais 3 vezes através de outras centrifugações, seguindo o protocolo de Zhang et al., (2001) ficando no final com um total de 750 µL de eritrócitos. Posteriormente preparou-se meio, LB agar com 6% de tampão fosfato com 5% de sangue de peixe. As estirpes foram inoculadas nas placas e mantidas na estufa a 28°C durante 48h. Após as 48h foram observadas as placas para verificar se as estirpes apresentavam capacidade hemolítica que é demonstrada pela hemólise dos eritrócitos presentes no do agar.

2.7. Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos

A presença de genes de resistência a antimicrobianos foi realizada para um total de 23 genes pertencentes a três classe de antimicrobianos; genes de resistência a quinolonas *qnrS*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qepA*; genes de resistência a β-lactâmicos: *blaIMP*, *blaVIM*, *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA*, *blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM* e genes de resistência à colistina: *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9*. Os primers utilizados, para a sua amplificação e as condições para cada um estão presentes no Anexo 6.2.

A realização da pesquisa de genes de resistência para estas estirpes foi feita com os *primers* nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95 ° C em 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C em 30 segundos, 35 ciclos de emparelhamento entre 50 e 60 °C em 30 segundos, 35 ciclos de extensão a 72 ° C entre 15 a 45 segundos e um ciclo de extensão final a 72 ° C em 5 minutos. As reações de PCR foram realizadas num volume final de 50 µl, tendo-se usado 25 µL de *taq* polimerase (NZTTaqII 2x colourless Master Mix (Nzytech), de acordo com as instruções do fabricante, 0.25 µM de *primer forward* e *reverse*, 5 µL de DNA e água miliQ estéril na quantidade suficiente para perfazer o volume final.

3. Resultados e Discussão

3.1. Testes de crescimento das estirpes estudadas

Podemos observar na Tabela 3.1, o crescimento de todas as estirpes utilizando TSA com 1% de NaCl e TSB com 1% de NaCl ambos a 28°C, seguido do meio TCBS com um crescimento, também, de 100% das estirpes do género *Vibrio*, porém não houve crescimento nas estirpes de *Y. ruckeri* quando inoculadas em meio TCBS. Observamos um efeito negativo do aumento da temperatura na resposta do crescimento destas estirpes, pois a 37°C os crescimentos diminuem para valores inferiores a 50% nos meios TSA com 1% de NaCl e TSB com 1% de NaCl e relativamente ao meio TCBS houve crescimento de quase todas as estirpes referentes ao género *Vibrio* e não houve crescimento das estirpes de *Y. ruckeri*

Tabela 3.1 - Testes de crescimento das estirpes estudadas em diferentes meios e temperaturas.

	Estirpes	Meios de crescimento					
		28°C			37°C		
		TCBS	TSA+1%NaCl	TSB+1%NaCl	TCBS	TSA+1%NaCl	TSB+1%NaCl
<i>Vibrio alginolyticus</i>	12M CECT S21	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio anguillarum</i>	10J AQV 55	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio harveyi</i>	Vh-017/18	+	+	+	+	-	-
	DSM 19623	+	+	+	-	-	-
<i>Yersinia ruckeri</i>	DSM 18506	-	+	+	-	-	-
	QSP 57.1	-	+	+	-	-	-

Os melhores resultados de crescimento foram obtidos a 28°C para os meios TCBS (Figura 3.1), TSA com 1% de NaCl (Figura 3.2) e TSB com 1% de NaCl (Tabela 3.1). O que vai de acordo com o trabalho de Charles et al. (2019) que demonstrou que microrganismos do género *Vibrio* crescem melhor em meios com adição de NaCl. Esta dependência de NaCl por parte das estirpes de *Vibrio* pode ser devido a funções osmóticas, pois o Na⁺ atua nos sistemas de permeação das bactérias que originam a entrada de substratos exógenos (Soto et al., 2019), o que permite a especificidade de

microrganismos para substratos sem gasto de energia (IPMA, 2020), o que comprova a necessidade de NaCl no meio para um crescimento ideal das estirpes de *Vibrio* (Kieffer et al., 2019).



Figura 3.1- Exemplo de crescimento em TSA + 1%NaCl a 28°C da estirpe de *Vibrio anguillarum* 10J Aqv 55



Figura 3.2- Exemplo de crescimento em TCBS a 28°C da estirpe de *Vibrio alginolyticus* 12M CECT S21

Por outro lado, Payne et al., (2015) sugere intervalos entre 20 e 40°C de temperatura nos quais os vibrios são capazes de crescer normalmente. Pesquisas recentes realizadas por Kalia et al., (2015) demonstram que as bactérias do género *Vibrio* podem crescer mesmo a temperaturas abaixo de 10°C e acima de 37°C, no entanto, isso é contraditório com os resultados observados neste trabalho, no qual o crescimento a 37°C foi impeditivo para metade dos isolados, o que pode ser devido as condições

ambientais de onde provêm as nossas amostras, a água do Atlântico que raramente excede 20°C (Krus, 2017).

3.2. Pesquisa de genes de virulência

Dos testes realizados com os 17 pares de *primers* selecionados para este trabalho, foram obtidos resultados positivos apenas para o gene *luxR* nas estirpes *Vibrio alginolyticus* 12M CECT S21 e *Vibrio harveyi* Vh-017/18 e para o gene *toxR* na estirpe 12M CECT S21.

Tabela 3.1- Resultados de PCRs, pesquisa genes de virulência para as diferentes estirpes

Genes	Estirpes						
	<i>Vibrio alginolyticus</i>		<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Vibrio harveyi</i>		<i>Yersinia ruckeri</i>	
	12M	CECT S21	10J Aqv55	Vh-017/18	DSM 19623	DSM 18506	QSP 57.1
<i>ctxA</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>ompU</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>zot</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>tcpA (toxR)</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>tcpA (El Tor)</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>tcpI</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>hlyA</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>hlyA (FW2)</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>stn/sto</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>luxR</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>vhh</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>vvh</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>yrp1</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>ompK</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>tlh</i>	-	-	-	-	-	-	-
VPI	-	-	-	-	-	-	-
<i>toxR</i>	+	-	-	-	-	-	-

Um estudo realizado por Rivera, (2001) verificou a presença de genes, nomeadamente *ctxA*, *ompU*, *zot*, *tcpA (toxR)*, *tcpA (El Tor)*, *tcpI*, *hlyA*, *hlyA (FW2)* e *stn/sto* em bactérias do género *Vibrio*. No entanto, os resultados obtidos no nosso trabalho não mostraram a presença destes genes nas estirpes estudadas (Tabela 3.2).

Xu et al., (2017) verificou no seu estudo a presença de genes, nomeadamente *vvh* e *vhh* em bactérias do género *Vibrio*. No nosso estudo, não foram verificadas a presença destes genes nas estirpes estudadas (Tabela 3.2).

Num estudo realizado por Eissa et al., (2008) foi verificada a presença de genes, nomeadamente *ypr1* na bactéria *Yersinia ruckeri*. No entanto, os resultados obtidos no nosso trabalho não mostraram a presença destes genes nas estirpes estudadas (Tabela 3.2).

Mohamed et al., (2015) observou no seu estudo a presença do gene *ompK* em bactérias do género *Vibrio*. No nosso estudo, com resultados obtidos no nosso trabalho não foi possível verificar a presença destes genes nas estirpes estudadas (Tabela 3.2).

Um estudo realizado por Xie et al., (2005) verificou a presença dos genes *tth* e *VPI* em bactérias do género *Vibrio*. No entanto, os resultados obtidos no nosso trabalho não mostraram a presença destes genes nas estirpes estudadas (Tabela 3.2).

A deteção *quorumsensing* (capacidade das bactérias de detetar e responder, através da regulação génica, à densidade celular) do *V. harveyi* contém três canais (cada um alimentado por um sinal diferente) alimentando uma cascata comum de transdução de sinais, da qual o *luxR* é o principal regulador (Xu et al., 2017).

Esta constatação é consistente com relatórios anteriores de que a patogenicidade de *V. harveyi* pode ser provocada devido à presença de múltiplos fatores de virulência. É claro que seria prematuro concluir que a virulência de *V. harveyi* é causada exclusivamente por este gene, e não podemos excluir a possibilidade de que outros genes de virulência (mesmo genes de virulência de outras espécies) também possam contribuir para a patogenicidade desta espécie (Zhu et al., 2017).

Um estudo realizado por Ruwandepika et al., (2010) verificou que os genes de virulência *luxR* estavam presentes em bactérias patogénicas da espécie *V. harveyi* enquanto a estirpe não patogénica desta espécie não possuía este gene no seu genoma, sugerindo que a existência destes genes pode contribuir para a patogenicidade do microrganismo. Nos resultados obtidos no nosso trabalho foi encontrada a presença do gene *luxR* para a estirpe ictiopatógena de *V. harveyi* Vh-017/18 (Figura 3.3 e tabela 3.2) enquanto a outra estirpe de *V. harveyi* DSM 19623 (isolada de um anfípode), não contém este gene (Tabela 3.2) podendo assumir que a presença deste gene contribui para a patogenicidade das bactérias em peixes de aquacultura, podendo causar a

letalidade destes e posteriormente a perdas significativas dos cultivos destes peixes se não for detectado antecipadamente tornando-se num tópico de grande importância.

No entanto, no nosso estudo foi encontrado a presença do gene *luxR* na estirpe de *V. alginolyticus* (Figura 3.3 e Tabela 3.2), porém estudos realizados para a presença deste gene nesta bactéria não foram encontrados na Europa. A estirpe *Vibrio harveyi* DSM 19623 foi considerada negativa para a presença do gene *luxR*, uma vez que não foi possível realizar a sequenciação deste produto de PCR e a repetição do PCR para a mesma estirpe foi negativo. (Anexo 6.9).

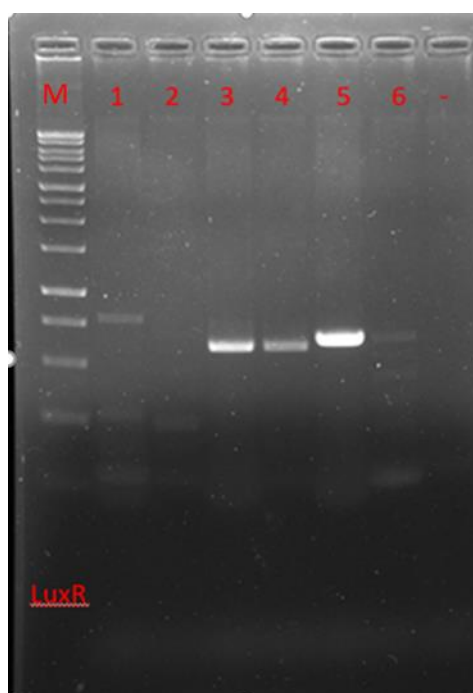


Figura 3.3 - Amplificação do gene *lux*

Gel de agarose a 1,5% com produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *lux*. M – Marcador de pesos moleculares. 1. estirpe *Yersinia ruckeri* QSP 57.1, 2. Estirpe *Yersinia ruckeri* DSM 18506, 3. Estirpe *Vibrio harveyi* Vh-017/18, 4. Estirpe *Vibrio harveyi* DSM 19623, 5. Estirpe *Vibrio alginolyticus* 12M CECT S21, 6. Estirpe *Vibrio anguillarum* 10J Aqv55, (-) controle negativo. Não houve controlo positivo.

O gene *toxR* foi identificado pela primeira vez como um regulador transcriptional positivo do gene *ctx*, que codifica a toxina da cólera em *V. cholerae*. A proteína transmembranar codificada pelo *toxR* desempenha um papel importante na regulação coordenada do *ctx* e de vários outros genes, incluindo a *tcp* (*pilli* coregulação codificante de toxinas) e os

genes *ompU* e *ompT* (codificando as principais proteínas da membrana externa) (Pang et al., 2019). O *toxR* está presente em espécies de *Vibrio*, incluindo *V. alginolyticus* e *V. harveyi* o que sugere que *V. alginolyticus* pode ser um importante reservatório de muitos genes de virulência conhecidos de outras espécies de *Vibrio* no meio aquático (Dong et al., 2020).

Estudos realizados por Dong et al., (2020) e Ruwandepika et al., (2010) verificaram a presença do gene *toxR* em *Vibrio alginolyticus*. No nosso estudo a estirpe ictiopatógena de *V. alginolyticus*, possuía o gene *toxR* (Figura 3.4) podendo assumir que a presença deste gene contribui para a patogenicidade desta bactéria podendo causar a letalidade destes e posteriormente a perdas significativas dos cultivos tornando-se num tópico de grande importância. No entanto os resultados obtidos no nosso trabalho não encontraram a presença do gene *toxR* na estirpe ictiopatógena *V. harveyi* Vh-017/18 (Tabela 3.2). As estirpes *Vibrio harveyi* Vh-017/18 e *Vibrio anguillarum* 10J AQV55 foram consideradas negativas para a presença do gene *toxR*, uma vez que não foi possível realizar a sequenciação destes produtos de PCR e a repetição do PCR para as mesmas estirpes foram negativos. (Anexo 6.10).

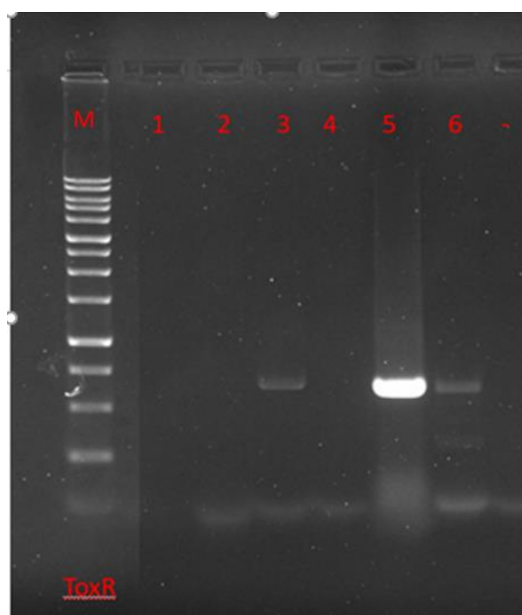


Figura 3.4- Amplificação do gene *tox*

Gel de agarose a 1,5% com produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *tox*. M – marcador de pesos moleculares. 1. estirpe *Yersinia ruckeri* QSP 57.1, 2. Estirpe *Yersinia ruckeri* DSM 18506, 3. Estirpe *Vibrio harveyi* Vh-017/18, 4. Estirpe *Vibrio*

harveyi DSM 19623, 5. Estirpe *Vibrio alginolyticus* 12M CECT S21, 6. Estirpe *Vibrio anguillarum* 10J AQV55, (-) controlo negativo. Não houve controlo positivo.

3.3. Testes fenotípicos de virulência

Para o teste proteolítico foram obtidos resultados positivos para 4 das 6 estirpes, nomeadamente, *Vibrio harveyi* Vh 017/16, *Yersinia ruckeri* DSM 18506, *Yersinia ruckeri* QSP 57.1, e para *Vibrio anguillarum* V10JAQV 55. As 2 estirpes que obtiveram resultados negativos foram *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21 e *Vibrio harveyi* DSM 19623.

No teste lipolítico 4 das 6 estirpes apresentaram resultados positivos, *Vibrio harveyi* Vh 017/16 *Yersinia ruckeri* QSP 57.1, *Vibrio anguillarum* V10J AQV55 e *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21. *Vibrio harveyi* DSM 19623 e *Yersinia ruckeri* DSM 18506 apresentaram resultados negativos neste teste.

Para a formação de biofilmes 3 das 6 estirpes apresentaram resultados positivos, nomeadamente *Vibrio harveyi* Vh 017/16, *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21 e *Vibrio anguillarum* V10J AQV55. As 3 estirpes que apresentaram resultados negativos foram *Vibrio harveyi* DSM 19623, *Yersinia ruckeri* DSM 18506 e *Yersinia ruckeri* QSP 57.1.

O teste da gelatinase apresentou resultados positivos para 3 das 6 estirpes, *Vibrio harveyi* Vh 017/16, *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21 e *Vibrio harveyi* DSM 19623. As estirpes que apresentaram resultados negativos foram *Vibrio anguillarum* V10J AQV55, *Yersinia ruckeri* DSM 18506 e *Yersinia ruckeri* QSP 57.1.

Por fim para o teste da hemolisina apenas 2 das 6 estirpes apresentaram resultados positivos, *Yersinia ruckeri* QSP 57.1 e *Vibrio anguillarum* V10J AQV55. As restantes estirpes *Vibrio harveyi* Vh 017/16, *Vibrio harveyi* DSM 19623, *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21 e *Yersinia ruckeri* DSM 18506 apresentaram resultados negativos para este teste.

Tabela 3.2- Resultado dos testes fenotípicos realizados para cada uma das estirpes.

Microrganismo	Estirpes	Proteolítico	Lipolítico	Formação de Biofilmes	Gelatinase	Hemolisina
<i>Vibrio harveyi</i>	DSM 19623	-	-	-	+	-
	Vh 017/16	+	+	+	+	-
<i>Yersinia ruckeri</i>	DSM 18506	+	-	-	-	-
	QSP 57.1	+	+	-	-	+
<i>Vibrio anguillarum</i>	V10J Aqv 55	+	+	+	-	+
<i>Vibrio alginolyticus</i>	V12M CECT S21	-	+	+	+	-

As proteases segregadas podem servir como fatores de colonização ou virulência para várias bactérias patogênicas que vivem em ambientes contendo muco, como o trato gastrointestinal. Além disso, foi sugerido que uma atividade proteolítica por parte das estirpes do género *Vibrio* degrada a mucina intestinal, permitindo um maior acesso aos recetores mucosais. Isto sugere que a protease pode facilitar a virulência. Pode ser apresentado um argumento semelhante para o papel da protease em espécies do género *Vibrio*, como *V. anguillarum* sendo que a atividade da protease ajuda a promover a colonização do intestino e da patogénese em peixes (Denkin e Nelson., 1999).

Estudos anteriormente realizados indicaram que a atividade proteolítica está presente em espécies do género *Vibrio* como o *Vibrio anguillarum* e *Vibrio harveyi* (Denkin e Nelson., 1999; Ottavani et al., 2009; Teng et al., 2017; De Silva et al., 2018) assim como para a *Yersinia ruckeri* (Yilmaz et al., 2018). No nosso estudo o facto da estirpe ictiopatógena de *Vibrio harveyi* e as estirpes de *Yersinia ruckeri* apresentarem esta capacidade (Figura 3.5 e tabela 3.3) pode significar que a capacidade proteolítica contribui para a patogenicidade da bactéria provocando a morte do peixe hospedeiro.



Figura 3.5- Exemplo da atividade proteolítica da estirpe de *Vibrio harveyi* Vh 017/16.

A atividade lipolítica desempenha um papel importante no estabelecimento de infecções em seres vivos como peixes, perturbando as funções do sistema imunitário permitindo depois a propagação da bactéria. Esta capacidade tem sido cada vez mais ligada à virulência microbiana, uma vez que está envolvida na degradação dos componentes das células dos peixes hospedeiros, melhorando a aderência, contribuindo para a nutrição celular e evitando a célula hospedeira (Hossain et al., 2020)

You et al. (2007), Teng et al., (2017), De Silva. (2018) e Hossain et al. (2020) realizaram estudos em que indicaram que espécies do género *Vibrio* têm a capacidade lipolítica, assim como, Delshad et al., (2018) indicou que a espécie *Yersinia ruckeri* tinha esta capacidade. No nosso estudo foram verificados resultados positivos para todas as estirpes menos para as estirpes de coleção de *Vibrio harveyi* DSM 19623 e *Yersinia ruckeri* DSM 18506 como mostra na tabela 3.3 podendo indicar que o facto das estirpes patogénicas possuírem a capacidade lipolítica, como é o caso de *Yersinia ruckeri* QSP 57.1 (Figura 3.6) pode significar que a capacidade lipolítica contribui para a patogénicidade da bactéria de tal forma que pode mesmo provocar a morte do peixe hospedeiro.

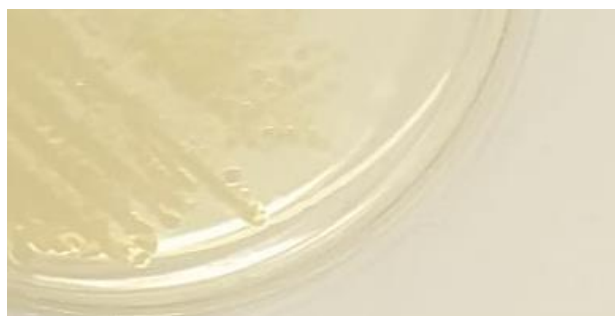


Figura 3.6- Exemplo da atividade lipolítica por parte da estirpe de *Yersinia ruckeri* QSP 57.1

A sobrevivência de espécies patogénicas do género *Vibrio*, tanto no ambiente natural como nos organismos hospedeiros, é suscetível de ser melhorada se as células existirem em biofilmes. A formação de biofilmes provocada pelas bactérias do género *Vibrio*, nos hospedeiros, especialmente no ambiente de aquacultura podem contaminar toda a cultura de peixes e aumentar a prevalência da Vibriose (You et al., 2007)

A absorção de vermelho do Congo é usada para detetar a produção deste muco bacteriano. O muco bacteriano é muitas vezes associado a um muco que envolve a superfície bacteriana e permite que as bactérias formem biofilmes nas superfícies dos

hospedeiros e assim induzir a patogenicidade em peixes. Este permite que as bactérias formem biofilmes induzindo também a resistência antimicrobiana (De Silva et al., 2018) Lee et al., (2016) e De Silva et al., (2018) afirmam que espécies do género *Vibrio* entre as quais *V. harveyi*, *V. anguillarum* e *V. alginolyticus* apresentam a capacidade de formação de biofilme. No estudo realizado por Nguyen (2020) este afirma que a *Y. ruckeri* apresenta formação de biofilme. No nosso estudo o facto das estirpes de *Vibrio anguillarum* V10J AQV 55, *Vibrio alginolyticus* V12M CECT S21 e *Vibrio harveyi* Vh 017/16 apresentarem esta capacidade (Figura 3.7). O facto das estirpes *V. harveyi* Vh-017/18 e *V. alginolyticus* 12M CECTS21 apresentarem a formação de biofilmes pode-se dever ao facto de estas possuírem o gene *luxR* no seu genoma (Tabela 3.2) uma vez que este tem a capacidade de formação de biofilmes (Guan et al., 2019) podendo significar que a capacidade de formação de biofilmes por parte das bactérias poderá contribuir para a sua patogenicidade em peixes.



Figura 3.7- Exemplo de formação de biofilmes da estirpe de *Vibrio harveyi* Vh 017/16 (tubo vermelho escuro) quando comprada com a estirpe *Vibrio harveyi* DSM 19623 (tubo vermelho).

Espécies do género *Vibrio* segregam muitas enzimas extracelulares, incluindo a gelatinase que provoca a lise de componentes celulares. A deteção deste fator de virulência tem sido usada para investigar a patogenicidade dos vibrios em peixes. A gelatinase é uma enzima hidrolítica extracelular que ajuda as estirpes deste género nos mecanismos de invasão e colonização no peixe hospedeiro (Dahanayake et al., 2018).

Estudos de Teng et al, (2017) e Dahanayake et al., (2018) apresentaram resultados para a presença de gelatinase nas suas espécies do género *Vibrio*, entre elas *V. alginolyticus*. No nosso estudo todas as estirpes do género *Vibrio* apresentaram resultados positivos como é o caso de *V. harveyi* DSM 19623 (Figura 3.8) excetuando a estirpe de *V.*

anguillarum V10J AQV 55. No entanto as estirpes de *Y. ruckeri* também não apresentaram resultados positivos no nosso estudo como mostra na tabela 3.3

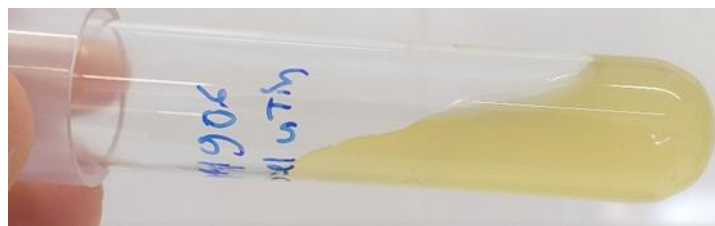


Figura 3.8- Exemplo da atividade de gelatinase por parte da estirpe de *Vibrio harveyi* DSM 19623.

A hemolisina é uma toxina que ataca as membranas de eritrócitos de peixes causando a lise celular. Na maioria dos casos, as evidências baseadas em experiências *in vivo* ou relatórios clínicos sugerem que o envolvimento da capacidade hemolítica por parte de espécies do género *Vibrio* desempenha certamente um papel importante no processo de infecção podendo causar a morte do peixe hospedeiro (Mizuno et al., 2020).

Em estudos realizados por Zhang et al., (2001), Teng et al., (2017), Çai e Zhang., (2018) e Mizuno et al., (2020) todos descreveram uma capacidade hemolisina positiva para espécies do género *Vibrio* em peixes. Guijarro et al., (2018) e Acuña et al., (2021) indicaram nos seus estudos que a *Y. ruckeri* apresentava a capacidade hemolítica em peixes. No nosso estudo foi verificada a capacidade hemolítica por parte da estirpe de *V. anguillarum* V10J AQV 55 (Figura 3.9) e da estirpe de *Y. ruckeri* QSP 57.1.0 que pode significar que a capacidade hemolítica contribui para a patogenicidade da bactéria em peixes.

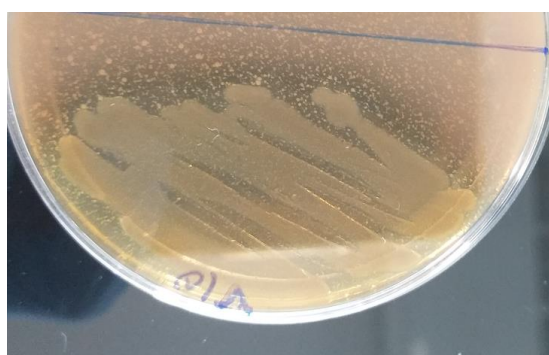


Figura 3.9- Exemplo da atividade hemolítica por parte da estirpe de *V. anguillarum* V10J AQV 55

3.4. Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos

Dos testes realizados com os 23 pares de *primers* selecionados para este trabalho, não foram obtidos resultados positivos para nenhum dos genes em estudo.

Várias investigações foram realizadas sobre a resistência apresentada por membros do género *Vibrio* a vários tipos de antimicrobianos sendo que a resistência a β -lactâmicos tem sido comumente demonstrada através da presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, e *bla*_{NDM-1} (Silvester et al. 2019). Resultados semelhantes aos descrito não foram encontrados neste trabalho uma vez que nenhuma estirpe possuía nenhum destes genes de resistência.

Zhang et al., (2018) encontraram genes de resistência à quinolona (*qnr* e *qepA*) em membros do género *Vibrio*. No entanto, os resultados obtidos no nosso trabalho não mostraram a presença destes genes nas estirpes estudadas.

A resistência à colistina mediada por genes *mcr*, praticamente não foi relatada em bactérias do género *Vibrio*, existe apenas uma publicação para *V. parahaemolyticus* (Lei et al., 2019), cujo trabalho foi realizado a partir de alimentos na China; os resultados obtidos no nosso trabalho não mostraram a presença destes genes nas estirpes estudadas.

4. Conclusão

Com os resultados obtidos para os genes de virulência e para os testes fenotípicos podemos concluir que os genes *luxR* e *toxR* estão presentes em estirpes do género *Vibrio* assim como todas as características de virulência analisadas neste estudo, verificando-se que a presença destes genes, assim como a sua expressão, e a presença destas características de virulência nestas estirpes fazem com que estas se tornem bastante problemáticas para peixes em aquacultura, provocando altas taxas de mortalidade nos cultivos e levando a perdas económicas significativas. Para combater estas estirpes o mais indicado será a deteção destas antecipadamente e o combate contra a sua presença com a utilização de probióticos, vacinação numa fase juvenil destes peixes e estratégias de imunoestimulação.

Podemos concluir também que o facto de as bactérias apresentarem a formação de biofilmes se deve ao facto de estas possuírem o gene *luxR* no seu genoma uma vez que este contribui para a capacidade de formação de biofilmes (Guan et al., 2019).

Para o teste de resistência a antimicrobianos foi testado um elevado número de genes de resistência, porém nenhuma das estirpes apresentava nenhum destes genes de resistência a β -lactámicos, quinolonas ou à colistina.

Como perspectivas futuras será necessária uma identificação mais específica das espécies de *Vibrio* presentes em peixes de aquacultura assim como de outras bactérias ictiopatógenicas como é o caso de *Photobacterium damsela* subs. *piscicida*.

A pesquisa e utilização de muitos outros genes para estudar mais detalhadamente a virulência e resistência específicos por parte destas bactérias assim como a realização de mais testes fenotípicos de virulência.

5. Referências Bibliográficas

- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., Gupta, R.S., 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., Morgane. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 5575–5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Álvarez, Martínez, López, & Alfayate., 2017. Revisión Quinolonas en Pediatría. 19(74), undefined-undefined.
- Altinok I., Capkin E., Kayis S., 2011 Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. *Veterinary Microbiology* 131: 332–338
- 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., Austin, D.A., 2016. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish, sixth edition, *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, Sixth Edition*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0>
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J., 2018. *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>
- 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. *Front. Microbiol.* 8, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00121>
- Blakely, G. W., 2014. Mechanisms of Horizontal Gene Transfer and DNA Recombination. In *Molecular Medical Microbiology: Second Edition* (Vols. 1–3, pp. 291–302). Elsevier Ltd.
- Bruslind, L., 2021. Biology LibreText. Bacterial Pathogenicity.
- Cai, Q., Zhang, Y., 2018. Microbial Pathogenesis Structure , function and regulation of the thermostable direct hemolysin (TDH) in pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb. Pathogenesis.* 123, 242–245. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.02>
- Carson, J., Wilson, T., 2009. Yersiniosis in Fish. *Aust. New Zeal. Stand. Diagnostic Proced.* 1–19. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0026-0_5
- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldimann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M., 2019. Identification of novel mobilized colistin resistance gene mcr-9 in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* isolate. *MBio*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>
- Charles, K., Angelo, P., & Jones, J., 2019. BAM: *Vibrio* | FDA. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-Vibrio>
- Curtis, H., & Schnek, A., 2000. Curtis. *Biología - Helena Curtis, Adriana Schnek* - Google Libros. https://books.google.pt/books?id=mGadUVpdTLsC&printsec=frontcover&hl=es&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Dahanayake, P. S., Hossain, S., Wickramanayake, M. V. K. S., Wimalasena, S. H. M. P., & Heo, G. J., 2019. *Manila clam* (*Ruditapes philippinarum*) marketed in Korea as a source of vibrios harbouring virulence and β -lactam resistance genes. *Letters in Applied Microbiology*.

- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V.N., Hoseinifar, S.H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., Joshi, S.K., 2017. Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 25, 184–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1261277>
- 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
- Daubin, V., & Szöllösi, G. J., 2016. Horizontal gene transfer and the history of life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018036>
- Delshad, S.T., Bossier, P., Sharifiyazdi, H., 2018. Effect of quorum quenching bacteria on growth, virulence factors and biofilm formation of *Yersinia ruckeri* in vitro and an in vivo evaluation of their probiotic effect in rainbow trout 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfd.12840>
- Denkin, S.M., Nelson, D.R., 1999. Induction of Protease Activity in *Vibrio anguillarum* by Gastrointestinal Mucus 65, 3555–3560.
- DGRM 2020- Direção Geral de Recursos Marinhos, I.P: <https://www.dgrm.mm.gov.pt/web/guest/aquicultura1>
- Duman, M., Saticioglu, I.B., Altun, S., 2018. Akuakültürden İzole Edilen *Y. ruckeri* ve *L. garvieae* İzolatlarının Hızlı Teşhisi ve Biyokimyasal Farklılıklarının Belirlenmesi. *Uludağ Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.* 37, 24–30. <https://doi.org/10.30782/uluvfd.399275>
- Dong, Y., Zhao, P., Chen, L., Wu, H., Si, X., Shen, X., Shen, H., Qiao, Y., Zhu, S., Chen, Q., Jia, W., Dong, J., Li, J., Gao, S., 2020. Fast, simple and highly specific molecular detection of *Vibrio alginolyticus* pathogenic strains using a visualized isothermal amplification method. *BMC Vet. Res.* 16, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02297-4>
- FAO 2020 The State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries & Aquaculture Department. Rome.
- Fresnadillo, M., Garcia, M., Garcia, E., & Garcia, J., 2015. Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X10700318>
- 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
- Garcia, Castillo, & Salazar., 2014. Mecanismos de resistencia a β -lactámicos en bacterias gramnegativas.
- Guan, W., Wang, T., Huang, Q., Tian, E., Liu, B., Yang, Y., Zhao, T., 2020. A *LuxR*-type regulator, *AcrR*, regulates flagellar assembly and contributes to virulence, motility, biofilm formation, and growth ability of *Acidovorax citrulli*. *Mol. Plant Pathol.* 21, 489–501. <https://doi.org/10.1111/mpp.12910>
- Guichard, A., Cruz-Moreno, B.C., Aguilar, B., Van Sorge, N.M., Kuang, J., Kurkciyan, A.A., Wang, Z., Hang, S., Pineton De Chambrun, G.P., McCole, D.F., Watnick, P., Nizet, V., Bier, E., 2013. Cholera toxin disrupts barrier function by inhibiting exocyst-mediated trafficking of host proteins to intestinal cell junctions. *Cell Host Microbe* 14, 294–305. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.08.001>
- 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 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00218>

- 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
- Hickey, M.E., Lee, J.L., 2017. A comprehensive review of *Vibrio anguillarum*: ecology, pathology and prevention. *Rev, Aquac.* 10 (3), 1-26
- Hossain, S., De Silva, B.C.J., Dahanayake, P.S., De Zoysa, M., Heo, G.J., 2020. Phylogenetic characteristics, virulence properties and antibiogram profile of motile *Aeromonas spp.* isolated from ornamental guppy (*Poecilia reticulata*). *Arch. Microbiol.* 202, 501–509. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01762-5>
- Hu, M., Wang, N., Pan, Z.H., Lu, C.P., Liu, Y.J., 2012. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China 25, 224–233. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03281.x>
- Huang, Li, Huang, Lixing, Zhao, L., Qin, Y., Su, Y., Yan, Q., 2019. The regulation of oxidative phosphorylation pathway on *Vibrio alginolyticus* adhesion under adversities 1–15. <https://doi.org/10.1002/mbo3.805>
- INE. 2020.- INE-Estatística da pesca de 2019. Instituto Nacional de Estatística, I.P https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=435690295&PUBLICACOESmodo=2
- IPMA. 2020. IPMA - Temperatura da superfície do mar. <https://www.ipma.pt/pt/maritima/sst/>
- Jiang, D., Zhu, W., Wang, Y., Sun, C., Zhang, K. Q., & Yang, J., 2013. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: Recent advances and new strategies. In *Biotechnology Advances* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1562– 1574). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.005~>
- Kalia, V., Kumar, P., Kumar, R., Mishra, A., & Koul, S., 2015. Genome Wide Analysis for Rapid Identification of *Vibrio* Species. *Indian Journal of Microbiology*, 55(4), 375–383.
- Karl, D., & Perlin, D., 2011. Antibiotic Resistance: Understanding and Responding to an Emergent Crisis. https://books.google.pt/books?id=YUppJBKfWpWc&pg=PA83&lpg=PA83&dq=enzyme+MfpA&source=bl&ots=LLKekd7rcy&sig=ACfU3U3ibHCsDf75L6wLUXfRMsOaidZ93Q&hl=es419&sa=X&ved=2ahUKEwjn0Zzn_NbpAhWS2BQKHUdqCUEQ6AEwAXoECAoQAQ#v=onepage&q=enzyme MfpA&f=false
- Khedher, M. ben, Baron, S. A., Riziki, T., Ruimy, R., Raoult, D., Diene, S. M., & Rolain, J. M., 2020. Massive analysis of 64,628 bacterial genomes to decipher 57 water reservoir and origin of mobile colistin resistance genes: is there another role for these enzymes? *Scientific Reports*, 10(1). ht
- Kieffer, N., Royer, G., Decousser, J. W., Bourrel, A. S., Palmieri, M., de La Rosa, J. M. O., Jacquier, H., Denamur, E., Nordmann, P., & Poirel, L., 2019. *Mcr-9*, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(9).
- Kim, Y e Lee, 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
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., El-Matbouli, M., 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Vet. Res.* 46, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0238-4>
- Krus, P., 2017. Faculdade de Medicina Veterinária Instituto Superior de Agronomia Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos: Efeito do Transporte e Variação Temporal Entre Espécies Patrícia Krus Policarpo DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA-PRODUÇÃO AN. [https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/15226/1/Caracterização Microbiológica de Bivalves Vivos_Efeito do Transporte e Variação Temporal Entre Espécies.pdf](https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/15226/1/Caracterização%20Microbiológica%20de%20Bivalves%20Vivos_Efeito%20do%20Transporte%20e%20Variação%20Temporal%20Entre%20Espécies.pdf)

- 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
- Lee, J.S., Bae, Y.M., Han, A., Lee, S.Y., 2016. Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus* sp. *LWT - Food Sci. Technol.* 73, 707–714. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.023>
- Lee, Y., Kim, B.S., Choi, S., Lee, E.Y., Park, S., Hwang, J., Kwon, Y., Hyun, J., Lee, C., Kim, J.F., Eom, S.H., Kima, M.H., 2019. Makes caterpillars floppy-like effector-containing MARTX toxins require host ADP-ribosylation factor (ARF) proteins for systemic pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 18031–18040. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905095116>
- Lim, M.S., Ng, D., Zong, S., Arvai, A.S., Taylor, R.K., John, A., Craig, L., 2011. Mechanism for Pilus-Mediated Microcolony 77, 755–770. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07244.x.VIBRIO>
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism mcr-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168.
- Longo, S.B., Clark, B., York, R., Jorgenson, A.K., 2019. Aquaculture and the displacement of fisheries captures. *Conserv. Biol.* 33, 832–841. <https://doi.org/10.1111/cobi.13295>
- 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: 77-8
- Magarinos, B., 2017. Vibrissosis: *Vibrio anguillarum*, *V.ordalii* and *AliiVibrio salmonicida*. *Fish viruses Bact*
- Martínez, G., 2019. *Una pieza clave en la evolución.* 1, 1–12.
- Mizuno, T., Debnath, A., Miyoshi, S., 2021. Hemolysin of *Vibrio* Species.
- Mohamad, N., Amal, M.N.A., Yasin, I.S.M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N.S., Al-saari, N., Mino, S., Sawabe, T., 2019. *Vibriosis* in cultured marine fishes: a review. *Aquaculture* 512. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734289>
- Moreau, E., Thomas, T., Brevet, M., Thorin, C., Fournel, C., Calvez, S., 2019. Mutations involved in the emergence of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in France. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 1387–1394. <https://doi.org/10.1111/tbed.13175>
- 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
- Nelson, A.L., Roche, A.M., Gould, J.M., Chim, K., Ratner, A.J., Weiser, J.N., 2007. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect. Immun.* 75, 83–90. <https://doi.org/10.1128/IAI.01475-06>
- Önalán, Ş., Çevik, M., 2020. Investigation of the effects of some phytochemicals on *Yersinia ruckeri* and antimicrobial resistance 80, 934–942.
- Olson, R., Gouaux, E., 2005. Crystal Structure of the *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC) Pro-toxin and its Assembly into a Heptameric Transmembrane Pore. *Journal of Molecular Biology.* Volume 350, Issue 5, Pages 997-1016
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Santarelli, S., Masini, L., Di Trani, V., Canonico, C.,

- Pianetti, A., Tega, L., Carraturo, A., 2009. Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 132, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.014>
- Öztürk, R.Ç., Altinok, I., 2014. Bacterial and viral fish diseases in Turkey. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* 14, 275–297. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_1_30
- Pang, J., Wang, Q., Fei, Y., Zhu, P., Qiao, L., Huang, H., Dang, C., Gao, W., 2019. A real-time recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of *Vibrio harveyi*. *Mol. Cell. Probes* 44, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.01.001>
- Payne, G., Vandamme, P., Morgan, S., LiPuma, J., Coenye, T., & Jones, T. H., 2015. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3917–3927.
- Pokhrel, P., 2015. Gelatin Hydrolysis Test- Principle, Uses, Media, Procedure and Result. *Biochemical Test*
- Rincón, G., Radice, M., Giovanakis, M., di Conza, J. A., & Gutkind, G., 2014. First report of plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump *QepA* in *Escherichia coli* clinical isolate ST68, in South America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(1), 70–72.
- Rivera, I.N.G., Chun, J., Huq, A., Sack, R.B., *Icrobiol, A.P.P.L.E.N.M.*, 2001. Genotypes Associated with Virulence in Environmental Isolates of *Vibrio cholerae* 67, 2421– 2429. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.242>
- Ruwandeeepika, H.A., Defoirdt, T., Bhowmick, P.P., Shekar, M., Bossier, P., Karunasagar, I., 2010. Presence of typical and atypical virulence genes in *Vibrio* isolates belonging to the *Harveyi* clade. *J. Appl. Microbiol.* 109, 888–899. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04715.x>.
- Rodríguez, M., 2005. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(1), 25–31.
- Salah, F. D., Soubeiga, S. T., Ouattara, A. K., Sadji, A. Y., Metuor-Dabire, A., Obiri-Yeboah, D., Banla-Kere, A., Karou, S., & Simpoire, J., 2019. Distribution of quinolone resistance gene (*qnr*) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in Lomé, Togo. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 104.
- Shen, Y., Wu, Z., Wang, Y., Zhang, R., Zhou, H. W., Wang, S., Lei, L., & Li, M., 2018. Heterogeneous and flexible transmission of *mcr-1* in hospital-associated *Escherichia coli*. *MBio*, 9(4).
- Silva, Y.J., Costa, L., Pereira, C., Mateus, C., Cunha, Â., Calado, R., Gomes, N.C.M., Pardo, M.A., Hernandez, I., Almeida, A., 2014. Phage therapy as an approach to prevent *Vibrio anguillarum* infections in fish larvae production. *PLoS One* 9, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114197>
- Silva, P.S.D.B.C.J. De, Hossain, S., Wook, G., Heo, G.J., 2018. Occurrence , virulence factors , and antimicrobial susceptibility patterns of *Vibrio spp.* isolated from live oyster (*Crassostrea gigas*) in Korea 1–8. <https://doi.org/10.1111/jfs.12490>
- Soto, S., Lozano, R., Palacios, D., Bolan, C., & Rendon, K., 2019. Characterization and growth conditions of *Vibrio parahaemolyticus* strains with different virulence degrees that cause acute hepatopancreatic necrosis disease in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(5), 1002–1015.

- Sun, D., 2018. Pull in and push out: Mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP).
- Teng, T., Liang, L., Chen, K., Xi, B., Xie, J., Xu, P., 2017. Isolation, identification and phenotypic and molecular characterization of pathogenic *Vibrio vulnificus* isolated from *Litopenaeus vannamei* 1–10.
- Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., Chiers, K., 2007. Review of *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.* 30, 257–268.
- Tankeshwar, T., 2014. Gelatin Hydrolysis Test: Principle, Procedure and expected results. *Bacteriology, Biochemical tests in Microbiology, Laboratory Diagnosis of Bacterial Disease*
- Todar, K., 2020. Online text book of bacteriology. *Mechanisms of Bacterial Pathogenicity*
- UniProt. 2021. <https://www.uniprot.org/>
- Wilson, J.W., Schurr, M.J., Leblanc, C.L., Ramamurthy, R., Buchanan, K.L., Nickerson, C.A., 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity 216–224.
- Wrobel, A., Leo, J.C., Linke, D., 2019. Overcoming Fish Defences: The Virulence Factors of *Yersinia ruckeri*. *Genes (Basel)*. 10, 700. <https://doi.org/10.3390/genes10090700>
- Xu, X., Liu, K., Wang, S., Guo, W., Xie, Z., Zhou, Y., 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.015>
- Yang, Z., Wafula, E.K., Kim, G., Shahid, S., McNeal, J.R., Ralph, P.E., Timilsena, P.R., Yu, W. bin, Kelly, E.A., Zhang, H., Person, T.N., Altman, N.S., Axtell, M.J., Westwood, J.H., dePamphilis, C.W., 2019. Convergent horizontal gene transfer and cross-talk of mobile nucleic acids in parasitic plants. *Nat. Plants* 5, 991–1001. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0458-0>
- Yi, H., Yuan, B., Liu, J., Zhu, D., Wu, Y., Wang, M., Jia, R., Sun, K., Yang, Q., Chen, S., Liu, M., Chen, X., Cheng, A., 2017. Identification of a wza-like gene involved in capsule biosynthesis, pathogenicity and biofilm formation in *Riemerella anatipestifer*. *Microb. Pathog.* 107, 442–450. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.023>
- You, J., Xue, X., Cao, L., Lu, X., 2007. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66 1137–1144. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1074-x>
- Young, N., Brattland, C., Digiovanni, C., Hersoug, B., Johnsen, J.P., Karlsen, K.M., Kvalvik, I., Olofsson, E., Simonsen, K., Solås, A.M., Thorarensen, H., 2019. Limitations to growth: Social-ecological challenges to aquaculture development in five wealthy nations. *Mar. Policy* 104, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2019.02.022>
- Zhang, X.H., Meaden, P.G., Austin, B., 2001. Duplication of Hemolysin Genes in a Virulent Isolate of *Vibrio harveyi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3161–3167. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3161-3167.2001>
- Zhu, Z.M., Dong, C.F., Weng, S.P., He, J.G., 2018. The high prevalence of pathogenic *Vibrio harveyi* with multiple antibiotic resistance in scale drop and muscle necrosis disease of the hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*, in China. *J. Fish Dis.* 41, 589–601. <https://doi.org/10.1111/jfd.12758>

Zuo, J., Cai, H., Wu, Y., Ma, H., Jiang, W., Liu, C., Han, D., Ji, G., Yu, L., 2014. TCP10L acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.049>

6. Anexos

Anexo 6.1. Primers utilizados para os testes de virulência com as condições de cada um destes

Primer	Tamanho (bp)	Sequências	Tempo extração (seg)	Temperatura annealing (°C)	Referência
<i>ctxA</i>	564 bp	fw: CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G	60	40	RIVERA, 2001
		rev: CGA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC			
<i>ompU</i>	869 bp	fw: ACG CTG ACG GAA TCA ACC AAA G	60	40	RIVERA, 2001
		rev: GCG GAA GTT TGG CTT GAA GTA G			
<i>zot</i>	947 bp	fw: TCG CTT AAC GAT GGC GCG TTT T	60	40	RIVERA, 2001
		rev: AAC CCC GTT TCA CTT CTA CCC A			
<i>tcpA (toxR)</i>	779 bp	fw: CCT TCG ATC CCC TAA GCA ATA C	60	40	RIVERA, 2001
		rev: AGG GTT AGC AAC GAT GCG TAA G			
<i>tcpA (El Tor)</i>	451 bp	fw: CCT TCG ATC CCC TAA GCA ATA C	60	20	RIVERA, 2001
		rev: TTA CCA AAT GCA ACG CCG AAT G			
<i>tcpI</i>	862 bp	fw: TAG CCT TAG TTC TCA GCA GGC A	60	40	RIVERA, 2001
		rev: GGC AAT AGT GTC GAG CTC GTT A			
<i>hlyA</i>		fw: GGC AAA CAG CGA AAC AAA TAC C	60	20	RIVERA, 2001

	481 bp	rev: CTC AGC GGG CTA ATA CGG TTT A			
<i>hlyA</i> (<i>El Tor</i>)	738/727 bp	fw: GAG CCG GCA TTC ATC TGA AT rev: CTC AGC GGG CTA ATA CGG TTT A	60	40	RIVERA, 2001
<i>stn/sto</i>	172 bp	fw: TCG CAT TTA GCC AAA CAG TAG AAA rev: GCT GGA TTG CAA CAT ATT TCG C	55	20	RIVERA, 2001
<i>luxR</i>	618	fw: ATG GAC TCA ATT GCA AAG AG rev: TTA GTG ATG TTC ACG GTT GT	50	60	Xu et al., 2017
<i>vhh</i>	1404	fw: GAG GAC GTT TGG TGA GAT AA rev: ACG ACG AAT ACA ATC TCT GG	55	60	
<i>vvh</i>	222	fw: GCT ATT TCA CCG CCG CTC AC rev: CCG CAG AGC CGT AAA CCG AA	55	60	Eissa et al., 2008
<i>yrp1</i>	787	fw: GCG AGG AGG AAG GGT TAA GTG rev: GAA GGC ACC AAG GCA TCT CTG	60	30	
<i>ompK</i>	319	fw: GGC GGT CGC TCT GGT ATT rev: TTG CCA TCG TAA GTG CTG TA	55	60	Mohamed et al., 2015
<i>tth</i>	448	fw: AGC GGA TTA TGC AGA AC rev: GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC	54	60	Xie et al., 2005

<i>VPI</i>	680	fw: GCA ATT TAG GGG CGC GAC GT	52	60	Xie et al., 2005
		rev: CCG CTC TTT CTT GAT CTG GTA G			
<i>toxR</i>	658	GAT TAG GAA GCA ACG AAA G	54	60	Xie et al., 2005
		GCA ATC ACR TCC ACT TCC ACT GGT AAC			

Anexo 6.2. Primers utilizados para os testes de resistência com as condições de cada um destes

Primer	Tamanho (bp)	Sequências		Tempo extração (seg)	Temperatura annealing (°C)	Referencia	
<i>qnrS</i>	428	Fw	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	30	54	Cattoir, 2007	
		Re	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG				
<i>qnrA</i>	580	Fw	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	30	54		
		Re	TGCCAGGCACAGATCTTGAC				
<i>qnrB</i>	264	Fw	GGMATHGAAATTCGCCACTG	30	54		
		Re	TTTGCYGYCYGCCAGTCGAA				
<i>qnrC</i>		Fw		30	50		Wang, 2009
		Re					
<i>qnrD</i>	644	Fw	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	25	50		Cavaco, 2009
		Re	AACAAGCTGAAGCGCCTG				
<i>qepA</i>	596	Fw	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	20	50	Kim, 2009	
		Re	GTCTACGCCATGGACCTCAC				
<i>imp</i>	232	Fw	GGAATAGAGTGGCTTAA ^Y TCTC	15	50		
		Re	GGTTTAA ^Y AAAACAACCACC				
<i>vim</i>	390	Fw	GATGGTGTGGTGCATA	25	55		
		Re	CGAATGCGCAGCACCAG				
<i>kpc</i>	798	Fw	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	25	52		
		Re	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG				
<i>ndm</i>	621	Fw	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	25	52		
		Re	CGGAATGGCTCATCACGATC				
<i>oxa</i>	438	Fw	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	25	52		
		Re	CATCAAGTTCAACCCAACCG				

CTX-M	593	U1	ATGTGCAGYACCACTAARGTKATGGC	25	60	
		U2	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAVCAGCGG			
bla-SHV	747	Se	ATGCGTTATATTCGCTGTG	25	55	
		As	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA			
bla-TEM	445	Se	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	25	50	
		As	ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT			
mcr1	320	Fw	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	20		
		Re	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG			
mcr2	715	Fw	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	25		
		Re	TCTAGCCCGACAAGCATACC			
mcr3	929	Fw	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	30	58	Rebelo, 2018
		Re	AATGGAGATCCCCGTTTTT			
mcr4	1116	Fw	TCACTTTCATCACTGCGTTG	45		
		Re	TTGGTCCATGACTACCAATG			
mcr5	1644	Fw	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	45		
		Re	TCATTGTGGTTGCCTTTTCTG			
mcr6	556	Fw	GTCCGGTCAATCCCTATCTGT	25	55	
		Re	ATCACGGGATTGACATAGCTAC			
mcr7	892	Fw	TGCTCAAGCCCTTCTTTTCGT	30	55	Wang, 2018
		Re	TTCATCTGCGCCACCTCGT			
mcr8	667	Fw	AACCGCCAGAGCACAGAATT	30	60	
		Re	TTCCCCCAGCGATTCTCCAT			
mcr9		Fw	CGGTACCGCTACCGCAATAT			Kieffer, 2019
		Re	ATAACAGCGAGACACCGGTT			

Anexo 6.3. Sequência consenso do gene *toxR* para a estirpe *Vibrio alginolyticus* 12M CECT S21

Estirpe	Gene	Sequência FASTA
12M CECT S21	<i>ToxR</i>	<pre> CCTCNAGTTGGCAGANAGACCAACGAAGTTTTAAACCCGTAACGAGCTTCACGA GTTTGTT TGGCGTGAGCAAGGTTTTGAGGTGGATGACTCAAGCCTGACTCAAGCGATTTC TACTCTG CGTAAGATGTTGAAGGATTCAACAAAATCTCCAGAGTTTGTTAAAACGGTACCT AAACGT GGCTACCAACTCATTGTTTCAGTGAACGCTTGAGCCCATTTTCTACTGACTCT AACACT GACGTTGAAGAAACCGCTTCTGAACACGAAGCGCCAGCAGTGGAGTTAGAAGC GAGCGAT ACACCACCAACAGAGATAGTGACCGATACTACTGCTGATCTTGAGCCTCAAGTA GAGCCG ACTAAAACCTCAGCCGAAGCCAGCATCTAACACGATTAAGTGGCTACCGCGTGT CATTATC TTTTTGCTCTGCTGCTTCCTGTTTGCATTTGTTATTCACGAACCCTGCGGAAT CCCAA TTCCGTCAGATTGGTGAGTATCAAATGTACCAGTGATGACACCTGTAATCAC CCTCAA ATCAACAACCTGGTTGCCTTCAATAGAGCAATGCATTGAGCGCTACGTGAAGCA CCATGCA GAAGACTCGTTACCAGTGAAGTTGATTGCAA </pre>

Anexo 6.4. Resultado da sequenciação do gene *luxR* para a estirpe *Vibrio alginolyticus* 12M CECT S21

Bactéria	Gene	Sequência FASTA
<i>Vibrio alginolyticus</i> 12M CECT S21	<i>luxR</i>	<pre> CAAGGCTTCTCAATTAAGCGTAAGCAACAGTTAATGGGAAATCGCATTGG AAGTATTTGC GCGCCGCGGCATCGGTCGTGGTGGTCACGCAGATATCGCAGAAATTGCT CAAGTTTCTGT GGCGACTGTTTTAACTACTTCCCTACACGCGAAGACTTGGTGGATGAAG TTCTCAATCA CGTCGTACGTCAGTTCTCAAACCTTCTATCGGATAACATAGACCTAGACT TACATGCACG TGAAAACATCGCCAATATACTAATGCGATGATCGAGCTTGTGAGCCAAG ACTGTCACTG GCTAAAGGTATGGTTGAGTGGAGTGCTTCAACACGTGATGAAGTATGG CCATTGTTTGT TTCAACTAACCGTACTAACCAGTTGCTGGTACAAAACATGTTTCATTAAAGC AATTGAACG CGGTGAGGTGTGTGACCAGCACGATTCAGAACACTTGCCAAACCTGTTT CACGGTATTTG TTACTACTGTTTGTCCAAGCGAACCAGCGCTAAAGGTGAAGCGGAACTG AAACATCTAGT GAATTCATACTTAGATATGCTTTGCATTTACAACCGTGAACATCACTAAAA </pre>

Anexo 6.5. Resultado da sequenciação do gene *luxR* para a estirpe *Vibrio harveyi* Vh 017/18

Bactéria	Gene	Sequência FASTA
<i>Vibrio harveyi</i> Vh 017/18	<i>luxR</i>	CAAGGTTTCCCTCTAAACGTAACAGCAACTAATGGGAAATCGCTCTTGAAGTGT TTGCT CGTCGCGGCATTGGTCGTGGTGGTCACGCTGATATTGCAGAGATTGCTCAAGTT TCTGTT GCGACAGTATTTAACTACTTCCCAACTCGCGAAGACTTGGTGGATGAAGTTCTGA ATCAC GTGGTTCGTCAATTCTCGAACTTCTTATCAGATAACATCGACTTAGACATTCATGC ACGC GAGAACATCGCTAACATCACTAACGCAATGATTGAACTAGTAAGCCAAGATTGCC ATTGG TTGAAAGTTTGGTTCGAGTGGAGTGCATCAACACGTGATGAAGTGTGGCCACTA TTCGTA ACGACAACC GCACCAACCAACTGCTGGTGCAAAACATGTTTCATCAAAGCTATC GAACGT GGGGAAGTTTGTGACCAACATGAACCGAACACTTGGCGAATCTGTTCCATGGT ATTTGT TACTCTATCTTCGTACAAGCAAATCGCTCTAAGAGCGAAGCCGAGCTATCAACAC TCGTT AGTGCTTACCTAGATATGTTGTGCATCTACAACCGTGAACATCACTAAAA

Anexo 6.6. Resultado da sequenciação do gene *toxR* para a estirpe *Vibrio alginolyticus* 12M CECT S21 na bases de dados NCBI Blast

Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain FDAARGOS_114 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3372141	CP014045.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain FDAARGOS_110 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3434696	CP014040.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain K09K1 chromosome II, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3465619	CP017919.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain K08M3 chromosome I, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3468139	CP017913.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain K10K4 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3494647	CP017911.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain K06K5 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3471297	CP017907.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain K05K4 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3473579	CP017902.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain K04M5 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3470916	CP017899.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus isolate K04M3 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3476174	CP017896.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain K04M1 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3473127	CP017891.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus strain K01M1 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3468303	CP017889.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus NBRC 15630 = ATCC 17749 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus NBRC...	1125	1125	98%	0.0	99.20%	3334467	CP006718.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vibrio alginolyticus toxR gene for Cholera toxin transcriptional activator, isolate B1FVB17	Vibrio alginolyticus	1125	1125	98%	0.0	99.20%	879	LR860774.1

```

gene
1..879
/gene="toxR"

CDS
1..879
/gene="toxR"
  
```

Anexo 6.7. Resultado da sequenciação do gene *luxR* para a estirpe *Vibrio alginolyticus* 12M CECT S21 e comparação nas bases de dados

	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Vibrio alginolyticus strain FDAARGOS_114 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus	1055	1055	98%	0.0	99.48%	3372141	CP014045.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Vibrio alginolyticus NBRC 15630 = ATCC 17749 chromosome 1, complete sequence	Vibrio alginolyticus NBRC 15630...	1055	1055	98%	0.0	99.48%	3334467	CP006718.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Vibrio alginolyticus quorum sensing regulator LuxR gene, complete cds	Vibrio alginolyticus	1055	1055	98%	0.0	99.48%	960	EF598781.1

```

source          1..581
                 /organism="Vibrio alginolyticus"
                 /mol_type="genomic DNA"
                 /db_xref="taxon:663"
CDS             <1..>581
                 /codon_start=1
                 /transl_table=11
                 /product="quorum sensing regulator LuxR"
  
```

Anexo 6.8. Resultado da sequenciação do gene *luxR* para a estirpe *Vibrio harveyi* Vh-017/18 e comparação nas bases de dados

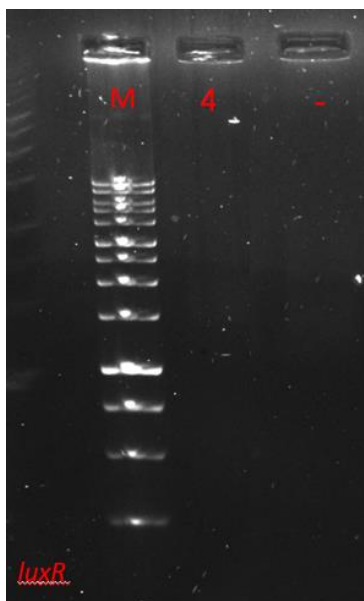
	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Vibrio harveyi LuxR (luxR) gene, partial cds	Vibrio harveyi	1059	1059	98%	0.0	99.32%	916	DQ108980.1

```

source          1..916
                 /organism="Vibrio harveyi"
                 /mol_type="genomic DNA"
                 /strain="B392"
                 /db_xref="taxon:669"
gene           223..>916
                 /gene="luxR"
  
```

Anexo 6.9. Amplificação do gene *lux* para a estirpe *Vibrio harveyi* DSM 19623

Gel de agarose a 1,5% com produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *lux*. M – Marcador de pesos moleculares 4. Estirpe *Vibrio harveyi* DSM 19623, (-) controlo negativo. Não houve controlo positivo.



Anexo 6.10. Amplificação do gene *tox* para as estirpes *Vibrio harveyi* Vh-017/18 e *Vibrio anguillarum* 10J AQV55

Gel de agarose a 1,5% com produtos de PCR resultantes da amplificação do gene *tox*. M – Marcador de pesos moleculares. 3. Estirpe *Vibrio harveyi* Vh-017/18 6. Estirpe *Vibrio anguillarum* 10J AQV55, (-) controlo negativo. Não houve controlo positivo.

