



**Soraia Andreia  
Coelho Mascarenhas**

**Nova abordagem para deteção das  
subespécies de *Photobacterium damsela***





**Soraia Andreia  
Coelho Mascarenhas**

**Nova abordagem para deteção das  
subespécies de *Photobacterium damsela***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia – Especialidade Biotecnologia Industrial e Ambiental (2º Ciclo), realizada sob a orientação científica do Doutor Newton Carlos Marcial Gomes, Investigador Principal do Departamento de Biologia, CESAM da Universidade de Aveiro, Portugal.



*Aos meus pais, sem eles,  
tudo isto não teria sido possível...*



## **O júri**

**Presidente**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal**  
Professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Orientador**

**Prof. Dr. Newton Carlos Marcial Gomes**  
Investigador Principal do Departamento de Biologia, CESAM da Universidade de Aveiro

**Arguente**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha**  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro





## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Doutor Newton Gomes, pela oportunidade oferecida, pelo incentivo e conhecimento transmitido, e acima de tudo, pela sua incessante disponibilidade para discussões de ideias e também pelos momentos mais descontraídos. Obrigada!

Pelo apoio financeiro do projeto AQUASAFE - Desenvolvimento de novas tecnologias para antecipar e diagnosticar surtos de doenças na aquicultura (PROMAR 31-03-05-FEP-0016) (PROMAR, um instrumento Português para os sectores das pescas e aquicultura financiados pelo Fundo Europeu das Pescas).

À Patrícia Martins, pela imensurável ajuda e apoio ao longo de todo este percurso, pela sua incessante paciência e amizade. Agradeço também por todo o conhecimento transmitido e disponibilidade para discussões de ideias. Um enorme obrigado Patrícia!

À Ana Cecília, não só por estar sempre pronta a ajudar-me, mas também pelas boas gargalhadas e bons momentos passados! Obrigada Ana!

Aos meus colegas de laboratório que ao longo do tempo se tornaram bons amigos, um grande obrigado tanto pelo apoio como pelos ótimos momentos. A todos, um grande obrigado!

A todos os meus amigos pelo apoio e incentivo. Obrigada a todos!

Aos meus queridos pais, por terem acreditado em mim e por me apoiarem incondicionalmente. Sem eles nada disto teria sido possível! Obrigada!

E por fim ao Mauro por ser o meu porto seguro! Agradeço-te pela companhia, por toda a paciência e tempo que dispensas-te para me ajudar. Obrigada Mauro!



## palavras-chave

Aquacultura, Agentes Patogénicos Bacterianos, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Gene *ToxR*, LAMP, PCR, Eletroforese em gel de agarose, DGGE, Desenho de *Primers*

## resumo

Em todo o mundo, os recursos para pesca encontram-se próximos dos limites de exploração sustentável. A prática de aquacultura é uma atividade que veio ajudar a contornar o esgotamento dos recursos pesqueiros, sendo hoje em dia responsável por contribuir com cerca de metade do fornecimento de peixe para consumo humano mundial. No entanto, a aquacultura é propícia ao aparecimento de surtos de doenças causadas por agentes patogénicos bacterianos. Estes geralmente têm um impacto nefasto nos sistemas de cultivo causando muitas vezes elevadas taxas de mortalidade e consequentes perdas económicas. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, são dois agentes patogénicos a que iremos dar especial atenção neste trabalho, uma vez que são responsáveis por provocar elevadas taxas de mortalidade em sistemas de aquacultura. Estas são caracterizadas por evidenciar uma difícil distinção entre si, apesar de apresentarem diferenças fenotípicas marcantes. Hoje em dia, recorre-se a inúmeras técnicas moleculares para o diagnóstico de doenças em aquacultura, pelo que, o objetivo do presente estudo foi avaliar a utilização dessas técnicas para deteção das duas subespécies de *P. damsela*, através da utilização do gene *ToxR* como marcador filogenético. Para o efeito, inicialmente testou-se a utilização da técnica de amplificação molecular LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*), caracterizada como sendo uma técnica isotérmica inovadora, de baixo custo e que apresenta elevada sensibilidade e especificidade. No entanto, ao longo deste estudo, não foram obtidos resultados de amplificação positivos, o que conduziu a uma mudança de abordagem. A deteção das duas subespécies em estudo só foi possível através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), sendo a análise e visualização dos fragmentos amplificados realizada através das técnicas de eletroforese em gel de agarose e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Os primers utilizados amplificaram fragmentos com cerca de 300 pb e a análise dos fragmentos obtidos por DGGE revelou que foi possível a distinção das duas subespécies. Foi também possível a sua deteção e distinção em amostras ambientais reais provenientes de sistemas de aquacultura.



**keywords**

Aquaculture, Bacterial fish pathogens, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *ToxR* gene, LAMP, PCR, Agarose gel electrophoresis, DGGE, Primer design , Environmental samples

**abstract**

Worldwide, fishing resources are close to the limits for sustainable exploitation. The aquaculture is an activity helping to circumvent the natural resource depletion, contributing currently with half of the fish supply for human consumption. However, this activity is propitious to diseases outbreaks caused by bacterial fish pathogens that usually have a harmful impact on cultivation systems, and often cause high mortality rates and consequent economic losses. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* are the two bacterial subspecies that we will give special attention in this work. They are responsible for high mortality rates in aquaculture systems. These subspecies are difficult to distinguish, despite having strong phenotypic differences. Nowadays, numerous molecular amplification techniques are available for the diagnosis of diseases in aquaculture. Therefore the aim of this study was to detect the two subspecies of *P. damsela* through the amplification of *ToxR* gene sequences (phylogenetic marker). For this purpose, we initially tested the use of the molecular amplification technique loop mediated isothermal amplification (LAMP), characterized as a novel low-cost isothermal technique, with high sensitivity and specificity. However, throughout this study, no positive results were achieved, leading to technical changes for development of an effective DNA-based detection of *P. damsela* subspecies. The detection of the two subspecies was achieved by development of a specific polymerase chain reaction (PCR) for these pathogens in combination with a denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). As expected, the used primers amplified fragments of about 300bp and the DGGE analysis achieved the distinction between the two subspecies. Their detection and distinction was also achieved in environmental samples from aquaculture systems.



# Índice

## I. Lista de Figuras

## II. Lista de Tabelas

<b>1. Aquacultura.....</b>	<b>1</b>
1.1 Desenvolvimento da Aquacultura no Mundo.....	2
1.2 Aquacultura em Portugal.....	2
<b>2. Impacto das Doenças de Caráter Bacteriano em Aquacultura.....</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> .....	7
2.2 <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> .....	8
2.3 Diagnóstico e deteção de agentes patogénicos.....	9
<b>3. Técnicas Moleculares.....</b>	<b>11</b>
3.1 Gene <i>Toxr</i> .....	11
3.2 <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR.....	12
3.2.1 Conceito PCR.....	12
3.2.2 Reação de PCR.....	13
3.2.3 Componentes da reação de PCR.....	15
3.2.1 Deteção de agentes patogénicos – bacterianos - PCR.....	16
3.3 <i>Loop mediated isothermal amplification</i> – LAMP.....	18
3.3.1 Conceito LAMP.....	18
3.3.2 Desenho de <i>primers</i> para a reação LAMP.....	20
3.3.3 Reação de amplificação LAMP.....	22
3.3.4 Visualização dos produtos LAMP.....	28
3.3.5 Deteção de agentes patogénicos – bacterianos - LAMP.....	28
3.4 Vantagens e Desvantagens.....	29
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>33</b>
<b>5. Materiais e Métodos.....</b>	<b>35</b>
5.1 LAMP.....	35
5.1.1 Desenho de <i>primers</i> .....	35
5.1.2 Testes de deteção das subespécies de <i>Photobacterium. damsela</i> .....	37
5.1.3 Testes para deteção de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	38

5.2	PCR.....	39
5.2.1	Metodologia geral e <i>primers</i> .....	39
5.2.2	Teste dos <i>primers</i> e otimização da temperatura de emparelhamento .....	41
5.2.3	Deteção das subespécies de <i>P. damsela</i> em amostras ambientais.....	42
5.2.4	Inoculação de uma amostra da ria de Aveiro com de DNA de <i>P. damsela</i> .....	43
5.2.5	Excisão de bandas de DGGE, amplificação e sequenciação .....	45
5.3	Visualização e análise dos produtos amplificados.....	46
5.3.1	Eletroforese em gel de agarose.....	46
5.3.2	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) .....	46
<b>6.</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>49</b>
6.1	LAMP.....	49
6.2	PCR.....	50
6.2.1	Teste dos <i>primers</i> e otimização da temperatura de emparelhamento .....	50
6.2.2	Deteção de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> e de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> em amostras ambientais .....	54
6.2.3	Inoculação de uma amostra ambiental para deteção das duas subespécies de <i>P. damsela</i> 60	
6.2.4	Excisão de bandas de DGGE e análise da sequenciação de DNA .....	62
<b>7.</b>	<b>Conclusões e Trabalho Futuro .....</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografia .....</b>	<b>67</b>



# I. Lista de Figuras

Figura 1– Representação gráfica da produção de aquacultura em Portugal de 2000 a 2009(adaptado [9]). .....	3
Figura 2 - Representação gráfica da variação da temperatura das diferentes etapas de uma reação de PCR ao longo do tempo. Inicialmente é representada a etapa da desnaturação inicial, seguindo-se os ciclos de uma reação de PCR (Ciclo 1, Ciclo 2, etc.). Cada ciclo é composto pelas seguintes etapas: Desnaturação (D), Emparelhamento (E) e Extensão (E) (adaptado de [42]). .....	14
Figura 3 – Representa�o esquemática dos passos envolvidos na técnica LAMP (adaptado de [63]). .....	19
Figura 4 – Representa�o esquemática da cadeia de DNA alvo (representada a vermelho) e respetivos <i>primers</i> utilizados na técnica LAMP, nomeadamente FIB, BIP, F3 e B3. São também representadas as seis regiões distintas da cadeia de DNA alvo (F3c, F2c, F1c, B1, B2 e B3) bem como as suas respetivas regiões complementares (F3, F2, F1, B1c, B2c e B3c) (adaptado de [37]). .....	20
Figura 5 - DNA alvo e respetiva cadeia complementar característica da rea�o LAMP. São também representadas as seis regiões distintas da cadeia de DNA alvo (F3c, F2c, F1c, B1, B2 e B3) bem como as suas respetivas regiões complementares (F3, F2, F1, B1c, B2c e B3c) (adaptado de [63]). [37]). .....	22
Figura 6 – Liga�o do <i>primer</i> FIB � cadeia de DNA alvo e conseqüente síntese de uma nova cadeia de DNA (adaptado de [63]). .....	23
Figura 7 – Liga�o do <i>primer</i> F3 � cadeia de DNA alvo (adaptado de [63]). .....	23
Figura 8 – Síntese da nova cadeia de DNA e conseqüente liberta�o da cadeia anteriormente formada após .....	23
Figura 9 – Emparelhamento das regiões complementares F1 e F1c e conseqüente forma�o do <i>loop</i> na cadeia de DNA libertada (adaptado de [63]). .....	23
Figura 10 – a. Emparelhamento do <i>primer</i> BIP � cadeia de DNA que contem o <i>loop</i> (adaptado de [63]). b. Síntese da nova cadeia de DNA que tem início na região B2 do <i>primer</i> BIP (adaptado de [63]). .....	24
Figura 11 – Emparelhamento do <i>primer</i> B3 � cadeia de DNA (adaptado de [63]). .....	24
Figura 12 – Forma�o de um segundo <i>loop</i> após liberta�o na nova cadeia de DNA (adaptado de [63]). .....	25
Figura 13 – Estrutura que a partir da qual se inicia a etapa de amplifica�o cíclica da rea�o LAMP (adaptado de [63]). .....	25
Figura 14 – Emparelhamento do <i>primer</i> FIB ao <i>loop</i> formado pelas sequências complementares F1c e F1 devido � sua complementaridade para com a sequência F2 (adaptado de [63]). .....	25

Figura 15 – Síntese simultânea das duas novas cadeias de DNA. Uma sintetizada a partir do <i>primer</i> FIB outra sintetizada a partir das sequências que formam o <i>loop</i> (adaptado de [63]).	26
Figura 16 – Início da síntese de uma nova cadeia de DNA sintetizada a partir das sequências que formam o <i>loop</i> (adaptado de [63]).	26
Figura 17 – A síntese da nova cadeia de DNA sintetizada a partir das sequências que formam o <i>loop</i> conduz a libertação de uma nova estrutura em forma de “altere” (adaptado de [63]).	26
Figura 18 – a. Início da síntese das novas cadeias de DNA. Uma formada a partir da estrutura em forma de altere e a outra a partir da estrutura anteriormente formada onde ocorre a ligação do <i>primer</i> BIP devido à sua complementaridade para com a região B2c localizada no <i>loop</i> . b. <i>Stem-loop DNAs</i> - estruturas resultantes de todo o processo de amplificação LAMP (produtos LAMP) (adaptado de [63]).	27
Figura 19 – Representação esquemática do protocolo utilizado: quantificação de DNA, inoculação de uma amostra ambiental, amplificação e análise.	44
Figura 20 – Representação esquemática do protocolo utilizado para a quantificação do DNA das duas subespécies em estudo (adaptado do protocolo fornecido com o kit - Quant-iT assays, Invitrogen).	44
Figura 21 - Representação esquemática do protocolo utilizado na excisão de bandas do gel de DGGE: excisão de bandas de DGGE, amplificação e sequenciação.	45
Figura 22 - Representação esquemática do protocolo geral utilizado para realização de um DGGE.	47
Figura 23 – Gel de agarose a 1% referente ao teste e otimização da Ta dos <i>primers</i> ; Produtos do 1ºPCR: Marc.– Marcador, Neg. – Controlo negativo, D.52°C, D.53°C, D.58°C, D.59°C, D.60°C, D.61°C – Produtos da amplificação de DNA puro de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> a diferentes temperaturas.	51
Figura 24 – Gel de agarose a 1% referente ao teste e otimização da Ta dos <i>primers</i> ; Produtos do 2ºPCR: M – Marcador, Neg. – Controlo negativo, D.57°C, D.58°C, D.59°C, D.60°C, D.61°C – Produtos resultantes da amplificação de DNA puro de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> a diferentes temperaturas.	51
Figura 25 – Géis de agarose a 1% referentes à amplificação a uma Ta de 61°C; a. Produtos do 1ºPCR; b. Produtos do 2ºPCR. M – Marcador, Neg. – Controlo negativo, P. - <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> , D. - <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> , Amb. – Amostra ambiental, V.sam. – <i>V. salmonicida</i> .	52
Figura 26 – Gel de agarose a 1% referente ao teste da especificidade do 1º conjunto de <i>primers</i> ; Produtos do 1ºPCR: M – Marcador, Neg. – Controlo negativo, P. - <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> , D. - <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> , A. sal. – <i>A. salmonicida</i> , V. par. – <i>V. parahaemolyticus</i> , V. sal.- <i>V. salmonicida</i> , V. vul. – <i>V. vulnificus</i> , V. alg. – <i>V. anguillarum</i> , M. mar. – <i>M. marinum</i> , P. ang. – <i>P. anguilliseptica</i> ; T. mar. – <i>T. maritimum</i> .	53
Figura 27 - Gel de agarose a 1% referente à detecção de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> e de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> em amostras ambientais; Produtos do 2ºPCR: M – Marcador, Neg. –	

- Controlo negativo, P. - *P. damsela* subsp. *piscicida*, D. - *P. damsela* subsp. *damsela*, P(RB1), P(RB2), P(RB3), L(RB1), L(RB2), L(RB3) – amostras ambientais amplificadas. .... 56
- Figura 28 – Gel de DGGE referente à deteção de *P. damsela* subsp. *piscicida* e de *P. damsela* subsp. *damsela* em amostras ambientais: M – Marcador, D + P – Marcador com *P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp. *damsela*, P. – Marcador de *P. damsela* subsp. *piscicida*, D. – Marcador de *P. damsela* subsp. *damsela*, P(RB1), P(RB2), P(RB3), L(RB1), L(RB2), L(RB3) – amostras ambientais amplificadas. .... 57
- Figura 29 – Gel de agarose a 1% referente à otimização da reação; Produtos do 1ºPCR: M – Marcador, Neg. – Controlo negativo, P.58°C, P.59°C, P.60°C, P.61°C, P.62°C, P.63°C – Produtos resultantes da amplificação de DNA puro de *P. damsela* subsp. *piscicida* a diferentes temperaturas utilizando acetamida, L(RB1)58°C, L(RB1)59°C, L(RB1)60°C, L(RB1)61°C, L(RB1)62°C, L(RB1)63°C - Produtos resultantes da amplificação da amostra ambiental L(RB1) a diferentes temperaturas utilizando acetamida. .... 58
- Figura 30 - Gel de agarose a 1% referente à otimização da reação; Produtos do 2ºPCR: M – Marcador, Neg. – Controlo negativo, P.62°C, P.63°C – Produtos resultantes da amplificação de DNA puro de *P. damsela* subsp. *piscicida* a diferentes temperaturas utilizando acetamida, L(RB1)62°C, L(RB1)63°C - Produtos resultantes da amplificação da amostra ambiental L(RB1) a diferentes temperaturas utilizando acetamida. .... 58
- Figura 31 – Gel de DGGE referente à otimização da reação: M – Marcador, D + P – Marcador com *P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp. *damsela*, P.61°C, P.63°C – Produtos resultantes da amplificação de DNA puro de *P. damsela* subsp. *piscicida*, Amb.61°C, Amb.63°C - Produtos resultantes da amplificação da amostra ambiental L(RB1). .... 59
- Figura 32 – Gel de DGGE referente à amplificação de amostras ambientais a uma Ta de 63°C: M – Marcador, D + P – Marcador com *P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp. *damsela*; P. – Marcador de *P. damsela* subsp. *piscicida*, D. – Marcador de *P. damsela* subsp. *damsela*, P(RB1), P(RB2), P(RB3), L(RB1), L(RB2), L(RB3) – amostras ambientais amplificadas. .... 60
- Figura 33 – Gel de DGGE exibindo o resultado da inoculação de uma amostra ambiental da ria de Aveiro: M – Marcador, D + P – Marcador com *P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp. *damsela*, P. – Marcador de *P. damsela* subsp. *piscicida*, D. – Marcador de *P. damsela* subsp. *damsela*, Amb N. – Amostra ambiental da ria de Aveiro, Amb.C. - Amostra ambiental da ria de Aveiro inoculada com DNA de *P. damsela* subsp. *piscicida* e *P. damsela* subsp. *damsela*. .... 61
- Figura 34 – a. Gel de DGGE referente à deteção de *P. damsela* subsp. *piscicida* e de *P. damsela* subsp. *damsela* em amostras ambientais (com Ta de 63°C): D + P – Marcador com *P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp. *damsela*, L(RB3), P(RB1), P(RB2) – amostras ambientais amplificadas; b. Excisão das bandas de DGGE da amostra L(RB3), onde se encontram destacadas a tracejado as bandas excisadas. .... 63
- Figura 35 – a. Gel de DGGE exibindo o resultado da excisão da banda de *P. damsela* subsp. *piscicida* da amostra ambiental L(RB3): DNA P. – DNA de *P. damsela* subsp. *piscicida* extraído da amostra ambiental L(RB3); b. Gel de DGGE exibindo o resultado da excisão da banda de DNA desconhecido da amostra ambiental L(RB3): DNA D. – DNA desconhecido extraído da amostra ambiental L(RB3); D + P – Marcador com *P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp.

*damsela*, P. – Marcador de *P. damsela* subsp. *piscicida*, D. – Marcador de *P. damsela* subsp. *damsela*, L(RB3) – amostra ambiental L(RB3). ..... 63

## II. Lista de Tabelas

Tabela 1 – Principais espécies produzidas em aquacultura em Portugal (adaptado de [9]).	3
Tabela 2 – Propriedades características das técnicas de amplificação molecular PCR e LAMP (adaptado de [35]).	31
Tabela 3 – Conjuntos de <i>primers</i> obtidos para a reação LAMP para cada uma das subespécies em estudo.	37
Tabela 4 – Reagentes e respetivos volumes e concentrações utilizados nas reações LAMP (testes).	38
Tabela 5 – Conjunto de <i>primers</i> utilizados por Chen <i>et al.</i> [77] para deteção de <i>V. parahaemolyticus</i> com a técnica LAMP.	38
Tabela 6 - Reagentes e respetivos volumes e concentrações utilizados nas reações LAMP para deteção de <i>V. parahaemolyticus</i> , apresentados por Chen <i>et al</i> [77].	39
Tabela 7 – Sequências de nucleótidos dos dois conjuntos de <i>primers</i> utilizados durante as reações de PCR [83].	40
Tabela 8 - Programas de amplificação (gerais) utilizados na realização do <i>nested</i> PCR. Onde Ta1 e Ta2 são variáveis que representam as temperaturas de emparelhamento utilizadas no 1ºPCR e 2ºPCR, respetivamente.	40
Tabela 9 – Programas de amplificação utilizados na realização do 1ºPCR e 2ºPCR, adaptado para a realização de reações a diferentes temperaturas de emparelhamento – 52°C, 53°C, 58°C, 59°C, 60°C e 61°C.	41
Tabela 10 – Reagentes e respetivos volumes e concentrações utilizados no 1ºPCR e 2ºPCR para o teste de diferentes temperaturas de emparelhamento dos <i>primers</i> .	42
Tabela 11 - Reagentes e respetivos volumes e concentrações utilizados no 1ºPCR e 2ºPCR para a otimização da deteção de <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> e de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> em amostras ambientais.	43
Tabela 12 - Reagentes e volumes utilizados na preparação das soluções a serem utilizadas no procedimento de DGGE (solução <i>High</i> e <i>Low</i> ).	48
Tabela 13 – Soluções e reagentes necessários para a revelação de um gel de DGGE.	48
Tabela 14 – Resultado da pirosequenciação, onde é possível consultar a abundância relativa da espécie <i>P. damsela</i> nas amostras de água ambientais, recolhidas numa aquacultura com sistema de recirculação de água. Foram recolhidas amostras da fonte de alimentação de água (Sup), do tanque de produção (Pro), do tanque de sedimentação (Sed), do reactor biológico (RB) e da câmara de Ozono (Ozo); de aquacultura de linguado (amostras: L(Pro), L(Sed), L(RB) e L(Ozo)) e de aquacultura de pregado (amostras: P(Pro), P(Sed), P(RB) e P(Ozo)).	55

Nova abordagem para detecção das subespécies de *Photobacterium damsela*

# 1. Aquacultura

O pescado proveniente da aquacultura contribui como uma importante fonte de alimento para grande parte da população mundial [1]. Em termos gerais, a prática de aquacultura refere-se à utilização e manipulação de massas de água, tanto naturais como artificiais, da qual resulta a produção de animais aquáticos consumidos pelo Homem. A aquacultura pode ser caracterizada como sendo, em simultâneo, um sector tanto com características tradicionais, como modernas, que engloba todas as atividades que digam respeito à produção, processamento e comercialização de plantas (algas e outras espécies) e de animais aquáticos - de água salgada, doce ou mesmo salobra - em diferentes estágios dos seus ciclos biológicos, nos quais estão incluídos peixes, crustáceos e moluscos [2, 3].

A aquacultura tem por objetivo principal a produção de proteína de origem animal para consumo humano durante todo o ano, o que promove um aumento do alimento disponível, assim como o valor económico deste no mercado. Esta tem por suporte um desenvolvimento sustentável, representando uma alternativa às formas tradicionais de abastecimento de pescado [2, 3]. As estratégias implementadas para o desenvolvimento da aquacultura no nosso país, seguem regulamentos e procedimentos que visam atingir uma sustentabilidade ambiental, económica e social desta atividade [4].

No sector da aquacultura, é extremamente importante tanto a seleção do local como o tipo de cultura a ser implementado, pelo que a sua compatibilidade deve ser tida em conta [3]. Dentro deste sector, podem ser utilizados três tipos de regimes de cultura: extensivo, semi-intensivo e intensivo (3). O regime extensivo enquadra-se no modelo de cultura mais antiga que existe, onde apenas se depende das condições naturais disponíveis no local de cultura. Neste tipo de regime, o controlo das condições do sistema é quase inexistente e a alimentação é exclusivamente natural (3). Por sua vez, o regime semi-intensivo é caracterizado por ter níveis de produção mais elevados e por recorrer a alguma tecnologia com o intuito de otimizar as condições de produção (colheitas de amostras e constantes calibrações) da espécie em cultivo. Neste caso a alimentação natural é complementada com alimentação artificial (3). Finalmente, o regime intensivo, apresenta níveis de produção extremamente elevados e detém altos níveis de controlo durante toda a fase de produção. Todo o ciclo reprodutivo e de crescimento da espécie é controlado, bem como a alimentação que é exclusivamente artificial (3).

Atualmente, as atividades de pesca estão próximas de atingir os limites de exploração sustentável, o que faz com que estes recursos se encontrem cada vez mais limitados. Com o crescente aumento de consumo de produtos do mar que se tem verificado ao longo dos anos, a prática de aquacultura assume especial relevância face a este panorama [4, 5]. Assim, a aquacultura é, hoje em dia, o sector de produção alimentar com o maior crescimento, sendo responsável por contribuir com metade do fornecimento de peixe para consumo humano em todo o mundo [4, 6].

## 1.1 Desenvolvimento da Aquacultura no Mundo

Desde 1970, o contributo da aquacultura para o fornecimento global de peixes, moluscos e crustáceos tem vindo a aumentar segundo uma taxa média anual de cerca de 8,8% [4].

No ano de 1995, estimou-se uma produção de 27,8 milhões de toneladas no sector da aquacultura e em 2010 foram fornecidas cerca de 148 milhões de toneladas de peixe provenientes de atividades de pesca e de aquacultura. Destas cerca de 128 milhões de toneladas tiveram como destino a alimentação humana. A Ásia destaca-se como sendo o continente com maior produção aquícola, tendo sido responsável em 2010 por 89% da produção mundial, dos quais 60% foram contributo da China, o maior país produtor a nível mundial. [1, 7].

## 1.2 Aquacultura em Portugal

A aquacultura em Portugal é uma prática com cerca de 100 anos [3]. Portugal, devido ao seu atraente contexto geográfico, possui inúmeras características com potencial para uma boa expansão e desenvolvimento do sector da aquacultura. Entre estas características, está o seu clima mediterrâneo, uma costa com cerca de 1230 Km com águas que variam entre os 13°C e os 18°C, estuários e lagoas de norte a sul [8].

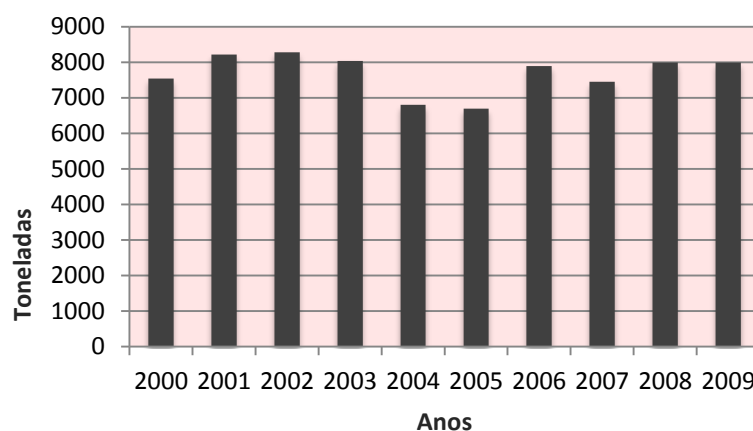
Em Portugal, as espécies mais produzidas em aquacultura marítima (água salgada) são: dourada (*Sparus aurata*), pregado (*Psetta maxima*), amêijoa (amêijoa boa (*Ruditapes decussatus*) e amêijoa macha (*Venerupis pullastra*)); em aquacultura de água doce, as mais produzidas são: truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) e truta comum (*Salmo trutta*) [4, 9]. No entanto, existe também a produção de outras espécies como se pode observar na Tabela 1. No final do ano de 2009, estavam registados em Portugal 1525 estabelecimentos de aquacultura de água salgada, doce e salobra [4, 9].



**Tabela 1** – Principais espécies produzidas em aquacultura em Portugal (adaptado de [9]).

Português	Inglês	Nome Científico
Truta arco íris	Rainbow Trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Truta comum	Brown trout	<i>Salmo trutta</i>
Amêijoia boa	Clam	<i>Ruditapes decussatus</i>
Amêijoia macha	Carpetshell	<i>Venerupis pullastra</i>
Berbigão	Cockle	<i>Cerastoderma edule</i>
Choco	Cuttlefish	<i>Sepia officinalis</i>
Dourada	Sea bream	<i>Sparus aurata</i>
Enguia	Eel	<i>Anguilla anguilla</i>
Linguado	Sole	<i>Solea spp.</i>
Longueirão curvo	Pod razor	<i>Pharus legumen</i>
Longueirão direito	Sword razor	<i>Ensis spp.</i>
Mexilhão	Mussel	<i>Mytilus spp.</i>
Ostra portuguesa	Portuguese cupped oyster	<i>Crassostrea spp.</i>
Ostra	Cupped oyster	<i>Ostrea spp.</i>
Pregado	Turbot	<i>Psetta maxima</i>
Robalo	Sea bass	<i>Disentrarchus labrax</i>
Sargo	White seabream	<i>Diplodus sargus</i>
Tainha	Mullet	<i>Mugil spp. / Liza spp.</i>

Entre 2000 e 2009, em Portugal a aquacultura foi responsável pela produção de cerca de 7940 toneladas por ano (Figura 1), verificando-se uma tendência de crescimento na produção em águas salgadas e salobras. A produção nestas águas continua a ser a mais preponderante neste sector, representando cerca de 88% da produção total no nosso país; sendo 40% referente à produção de peixe e 48% à produção de moluscos e crustáceos em relação ao total de produção [4, 9].

**Figura 1**– Representação gráfica da produção de aquacultura em Portugal de 2000 a 2009(adaptado [9]).



## 2. Impacto das Doenças de Caráter Bacteriano em Aquacultura

A escala de produção da aquacultura e a variedade de espécies cultivadas aumentou de forma exponencial nas últimas duas décadas, encontrando-se vulnerável a impactos negativos causados por condições ambientais e surtos de doenças [1, 10]. As doenças que assolam as espécies cultivadas podem ter a sua origem em transferências antropogénicas, na evolução de microrganismos não patogénicos para patogénicos ou, como acontece na sua maioria, nas trocas de organismos patogénicos entre espécies cultivadas e populações selvagens [10]. Os surtos de doenças podem restringir significativamente a produção aquícola e conseqüentemente o comércio, conduzindo a impactos negativos no desenvolvimento económico do sector em todo o mundo [7]. Nos últimos anos, os surtos de doenças têm assolado viveiros de criação de salmão do atlântico no Chile, de ostras na Europa e de camarão marinho em países como África, Ásia e América do Sul, conduzindo a perdas parciais ou por vezes totais de produção [1].

Do ponto de vista da aquacultura, uma das maiores preocupações reside na ocorrência de uma rápida multiplicação do agente patogénico e no seu alastrar para outros indivíduos da comunidade, onde podem ou não, ser exibidos sintomas de doença [11]. Assim, preocupações relacionadas com segurança alimentar e saúde humana, fazem com que medidas de controlo e prevenção sejam aplicadas na prática desta atividade, e promovam: a proteção do ambiente, o controlo de poluição, a monitorização e saneamento dos locais de aquacultura, o diagnóstico e tratamento de doenças em espécies cultivadas, a prevenção de epidemias, a implementação de medidas de controlo para prevenir tanto a propagação de doenças, como o desenvolvimento de estirpes resistentes a doenças através de seleção genética [5, 11, 12].

A crescente procura por produtos de origem aquícola, leva a que a grande maioria dos sistemas de aquacultura de todo o mundo continuem a intensificar os seus métodos de cultivo, recorrendo muitas vezes à produção de grandes densidades e volumes populacionais. Para tal, recorrem muitas vezes à utilização de espaços reduzidos (jaulas ou tanques de cultivo) e ao aumento das quantidades de ração e fertilizantes utilizadas [11]. Este aumento dos níveis de produção faz aumentar o risco de infeção, e conseqüentemente a propagação de doenças, o que leva à utilização exagerada de antibióticos, antifúngicos, pesticidas e desinfetantes [10, 11]. Muitas vezes, o aparecimento destas doenças está diretamente relacionado com alterações ambientais desfavoráveis, tais como: variações de temperatura e de pH, concentrações de oxigénio dissolvido inadequadas, manuseamento excessivos dos animais, dietas inadequadas, presença de toxinas ou aumento da concentração de metabolitos dissolvidos [7, 13]. Todos estes fatores, levam a que ocorra uma maior interação entre os indivíduos da espécie cultivada provocando *stress* ambiental [11]. Na maioria dos casos, as doenças reportadas em sistemas de aquacultura estão normalmente também presentes em populações de peixes selvagens, no entanto, em ambiente natural, as doenças raramente causam mortalidade [14].

Durante o período de incubação da infeção, caracterizado como sendo o intervalo entre a penetração do agente patogénico no hospedeiro e o aparecimento dos primeiros sintomas de

doença, o hospedeiro tenta constantemente eliminar o agente patogénico do seu sistema. Geralmente, uma infeção evolui de uma das seguintes formas: o organismo patogénico prolifera de tal maneira no hospedeiro que acaba por provocar mortalidade; as defesas imunitárias do hospedeiro conseguem promover a sua proteção; ou o hospedeiro entra num estado em que torna-se portador, existindo assim um equilíbrio entre o agente patogénico e hospedeiro não sendo evidenciados sintomas de doença [11]. Nesta fase de portador, o hospedeiro consegue disseminar o agente patogénico no ambiente em que se encontra ou pode mante-lo latente [11].

A suscetibilidade, e resistência de espécies cultivadas a agentes causadores de doenças dependem de barreiras físicas, tais como, a pele, as escamas, o exosqueleto, bem como da idade e da exposição. Uma vez que a transferência de doenças entre indivíduos pode ocorrer sem que estes evidenciem sintomas, as infeções podem assim passar despercebidas de indivíduo para indivíduo ou mesmo de geração em geração [11].

As principais doenças conhecidas no sector da aquacultura têm origem em infeções causadas por agentes patogénicos virais, bacterianos, fúngicos e por protozoários. Algumas delas podem também ser causadas por parasitas tais como os copépodes (pertencentes ao filo *Arthropoda*) e platelmintes (pertencentes ao filo dos *Platyhelminthes*).

Agentes patogénicos de origem bacteriana são a primeira causa de mortalidade em viveiros de criação de peixes, tendo também o seu impacto em espécies de peixes selvagens [15]. A identificação de doenças causadas por estes agentes patogénicos remonta a 1890, havendo desde então estudos que focam o seu controlo, prevenção e tratamento [15]. Muitas destas infeções, afetam tanto culturas de peixes como de marisco. Estas podem também manifestar-se na forma de infeções secundárias, através da associação a infeções de carácter viral o que dificulta a sua identificação e conseqüente diagnóstico [11]. Alguns exemplos de infeções bacterianas comuns, e que mais perdas provocam no sector da aquacultura, são: a furunculose, causada por estirpes da bactéria gram-negativa *Aeromonas salmonicida*; a doença da boca entérica vermelha (do inglês *enteric red mouth disease*), causada por estirpes da bactéria gram-negativa *Yersinia ruckeri*; a vibriose, causada por estirpes da bactéria *Vibrio anguillarum* e por estirpes da bactéria *P. damsela* subsp. *damsela* e a fotobacteriose, causada por estirpes da bactéria *P. damsela* subsp. *piscicida* [11, 16, 17].

As duas subespécies bacterianas, *P. damsela* subsp. *damsela* e *P. damsela* subsp. *piscicida*, pertencentes à espécie *P. damsela*, são responsáveis por provocar grandes perdas em sistemas de aquacultura por todo o mundo. A espécie *P. damsela* inclui bactérias marinhas gram-negativas pertencentes a estas duas subespécies, que causam duas doenças distintas de carácter virulento em diversos peixes. Ambas as subespécies são patogénicas para peixes, no entanto destaca-se a subespécie *P. damsela* subsp. *piscicida*, responsável por provocar infeções agudas, que conduzem a elevadas taxas de mortalidade. Características bioquímicas, fisiológicas e especificidade na escolha do hospedeiro, bem como a patogenicidade em humanos de *P. damsela* subsp. *damsela*, são alguns dos fatores que distinguem estas duas subespécies que assolam a aquacultura [17-19].

## 2.1 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

Em meados de 1981, Love *et al.* [16, 20, 21] identificou uma nova espécie *Vibrio*, a qual deu o nome de *Vibrio damsela*. No entanto, nunca concluiu os seus estudos de modo a justificar as evidentes discrepâncias entre esta espécie e outras pertencentes ao género *Vibrio*. Em 1984, Grimes *et al.*[22] demonstrou, com os seus estudos, haver uma baixa homologia entre a espécie *V. damsela* e outras espécies pertencentes ao género *Vibrio*; pelo que, em 1986 foi reclassificada por Macdonell *et al.* [16, 20, 21] para o género *Listonella* (*Listonella damsela*). Seguidamente, estudos moleculares demonstraram que esta bactéria estaria relacionada com espécies do género *Photobacterium*, pelo que em 1991 foi recolocada por Smith *et al.* [20] no género *Photobacterium* - *Photobacterium damsela*. Finalmente, em 1997, o seu nome foi corrigido para *Photobacterium damsela* por Truper *et al.* [16, 21], ficando então esta subespécie a ser conhecida como *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

A subespécie *P. damsela* subsp. *damsela*, começou por ser, inicialmente, isolada em 1981 a partir de lesões na pele de *Chromis punctipinnis*, uma das espécies de peixes castanheira (do inglês, *damsel fish*). Mais precisamente, foi isolada de úlceras com 5–20 mm de diâmetro, localizadas na barbatana peitoral (perto das aberturas branquiais do peixe) e pedúnculo caudal (geralmente caracterizada como sendo a zona mais comprida do corpo do peixe onde se insere a barbatana). Estas primeiras populações de peixes afetados, foram encontradas em águas costeiras do sul da Califórnia durante as épocas de verão e inverno. Por esta mesma altura, esta subespécie foi também encontrada em feridas humanas, o que levava a inferir desde cedo sobre a sua possível patogenicidade em humanos [21, 23].

Mais tarde, a patogenicidade em humanos foi confirmada, devido à capacidade desta bactéria em provocar infeções em feridas (e consequente septicemia) que, em alguns casos, conduz a variantes extremas de fascíte necrotizante, bastante severas que, podem mesmo ser fatais. Na maioria dos casos, as infeções em humanos tiveram a sua origem em exposições a água do mar, feridas feitas durante o manuseamento de peixe ou mesmo devido à ingestão de produtos do mar crus ou mal cozinhados [23]. Normalmente, a infeção causada por esta bactéria acontece em ambientes marinhos, pelo que, alguns estudos levam a crer que esta utiliza a água como “veículo” de transmissão (meio de propagação) [21, 24, 25].

*P. damsela* subsp. *damsela* é uma bactéria halófila que apresenta a forma de cocobacilos, um patogénico primário pertencente à família *Vibrionaceae* que infeta uma grande variedade de espécies marinhas, tanto as cultivadas em aquacultura como as selvagens. Esta, infeta maioritariamente, peixes e mamíferos, provocando úlceras na pele do hospedeiro e septicemia hemorrágica especialmente nos olhos, boca e musculatura. A sua patogenicidade foi parcialmente atribuída à sua capacidade de produção de grandes quantidades de exotoxinas e citolisina, pelo que, hoje em dia, ainda muito pouco se sabe sobre os fatores de virulência desta bactéria. Contudo, sabe-se que a virulência desta bactéria encontra-se dependente da temperatura, preferindo águas quentes (entre os 13 e os 20°C). Trata-se de um microrganismo autóctone, capaz de sobreviver em sedimentos e água do mar durante longos períodos de tempo (incluindo durante o período de inverno) e exibe elevada capacidade de preservar a sua patogenicidade e poder de infeção [24, 25]. Para além disto, alguns estudos indicam que esta é uma bactéria produtora de histamina (do inglês histamine-producing bactéria, de acrónimo HPB), uma vez que

é capaz de converter histidina em histamina através da atividade da enzima histidina descarboxilase. A ingestão de peixe contendo níveis elevados de histamina produzida por HPB, é prejudicial, uma vez que conduz ao intoxicamento alimentar [17, 26]. Muitas vezes, os surtos de doenças provocados por esta bactéria, ocorrem durante o período de maturação sexual do hospedeiro, uma vez que nestas condições o seu sistema oferece uma menor resistência devido às mudanças fisiológicas que ocorrem, estando assim mais suscetível à infecção. Até à data, não existe ainda uma vacina comercializada que ajude no seu combate [16, 18, 23, 24].

## 2.2 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

A fotobacteriose, é causada pela bactéria halófila *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Em casos crónicos, esta bactéria é responsável pela formação de granulomas (nódulos) de cor branca nos rins e baço do hospedeiro, dando-se assim uma acumulação no abdómen de células bacterianas, pelo que esta doença é também conhecida por pseudotuberculose. Trata-se de uma septicemia que assola a aquacultura marinha em diversas áreas geográficas, e que mesmo em casos agudos, poucos são os sintomas patológicos observados nos hospedeiros [12, 27].

Esta bactéria foi identificada pela primeira vez em 1963 nos Estados Unidos, como sendo responsável pela mortalidade de espécies de robalo do norte e de robalo muge (respetivamente *Morone americana* e *Morone saxatilis*) na região da Baía de Chesapeake. Após a sua análise, observou-se que se tratava de um organismo cujas propriedades aparentavam ser bastante semelhantes com o género *Pasteurella*, sendo a doença que provocava denominada por pasteurelose [25, 27-29]. Alguns estudos sobre a sua morfologia e fisiologia, levaram a que em 1964 Snieszko *et al.* [12, 27] e, mais tarde, em 1968 Janssen *et al.* [29] suspeitassem das suas semelhanças para com o género *Pasteurella*. Concluíram então que este organismo era extremamente homogéneo, porém, diferente das espécies conhecidas pertencentes ao género *Pasteurella*, pelo que, foi denominada como *Pasteurella piscicida*.

Em 1995, Gauthier *et al.* [28], através da utilização de análises taxonómicas e hibridação de DNA apercebeu-se que a *Pasteurella piscicida* estava relacionada com a espécie *Photobacterium damsela*, pelo que, esta foi então reposicionada como subespécie, passando a ser conhecida como *Photobacterium damsela* subs. *piscicida*. Como referido anteriormente, em 1997, Truper *et al.* [12, 16] corrigiu o nome da espécie para *Photobacterium damsela*, ficando então esta subespécie a ser conhecida como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Em 1969, esta bactéria foi responsável por provocar grandes perdas em viveiros de *Yellowtail jack* (*Seriola lalandi*), no Japão, tendo um impacto económico bastante negativo [25]. Em 1970, esta bactéria foi associada às perdas que ocorreram na Baía de Galveston, nos Estados Unidos - Texas, provocando já nesta altura grandes perdas em ambientes estuarinos, afetando duas espécies de peixe em particular: *Brevoortia tyrannus* e *Mugil cephalus* [30]. Desde 1990, esta bactéria tem vindo a propagar-se para outras espécies de peixes, provocando, grandes taxas de mortalidade, e consequentes perdas económicas em culturas marinhas de países mediterrâneos da Europa e nos EUA. Espécies de Dourada (*Sparus aurata*), Robalo (*Dicentrarchus labrax*) e de Linguado (*Solea solea* e *Solea senegalensis*) têm sido infetadas [12, 14]. Alguns estudos indicam que as maiores taxas de mortalidade dos hospedeiros ocorrem quando a temperatura da água se encontra acima dos 18-20°C, pelo que abaixo desta temperatura, o

hospedeiro pode torna-se portador através de uma infeção subclínica (não são evidenciados sintomas de doença) [14, 25].

Todas as estirpes de *P. damsela* subsp. *piscicida* têm características bioquímicas e fenotípicas idênticas, no entanto, observam-se diferenças no que toca ao seu grau de virulência, dependendo do tipo de hospedeiro. A patogenidade desta bactéria aparenta estar associada à sua produção de produtos extracelulares, nomeadamente, à presença de atividade de fosfolipases termolábeis (responsáveis pela sua virulência), que podem também ser encontradas em outros agentes patogénicos, tais como *A. salmonicida* e *P. damsela* [28, 31].

Desde 1997, têm-se vindo a desenvolver variadas técnicas que têm por base protocolos com DNA, possibilitando uma rápida e específica detecção desta bactéria. A aplicação e desenvolvimento de técnicas moleculares que sejam rápidos, sensíveis e específicos são de extrema importância para a detecção da fotobacteriose, uma vez que esta pode ser transmitida através de fluido seminal e pelos ovários por indivíduos aparentemente saudáveis. Na fase de infeção esta bactéria não é cultivável, o que faz com que a sua detecção seja extremamente difícil.

Um dos recursos mais utilizados para o controlo desta doença, baseia-se na administração de antibióticos em rações após o aparecimento dos sintomas clínicos, pelo que, a imunização recorrendo a vacinas apresenta-se como uma abordagem viável. Hoje em dia, encontram-se disponíveis variadas vacinas que previnem a infeção por *P. damsela* subsp. *piscicida*; no entanto, a sua eficácia encontra-se dependente de alguns fatores, tais como a espécie de peixe, o seu tamanho e da utilização de imunoestimulantes [14, 28].

## 2.3 Diagnóstico e detecção de agentes patogénicos

O diagnóstico, tratamento e controlo de doenças dos animais criados em sistemas de aquacultura é geralmente baseado nos sinais clínicos evidenciados, na identificação e isolamento do agente etiológico [7, 32, 33].

Tradicionalmente, o diagnóstico de agentes patogénicos em aquacultura recorre à utilização de técnicas de cultivo (para caracterização das suas propriedades fenotípicas e serológicas ou examinação histológica), análises *post-mortem* (necropsia) e de histopatologia para examinação dos efeitos no tecido do hospedeiro. Para além disso, algumas técnicas como os testes bioquímicos, homologia de DNA e variabilidade de proteases têm vindo a ser usadas ao longo dos anos. No entanto, no seu geral, estes métodos evidenciam falta de especificidade e sensibilidade, exigindo muitas vezes o isolamento prévio do agente patogénico (o que em muitos casos pode não ser possível ou ser muito complicado), o que pode ser bastante moroso. Estes, apresentam também limitações de detecção, tanto de baixas concentrações de agentes patogénicos, bem como em casos de ausência de sinais clínicos de doença [7, 32, 33]. Assim, torna-se necessário a utilização (desenvolvimento) de métodos de diagnóstico rápidos e sensíveis [7, 32, 33].

Hoje em dia, o diagnóstico de doenças em aquacultura combina ou substituiu a utilização de técnicas tradicionais (análises bacteriológicas, histopatologia, isolamento de vírus), com a utilização de técnicas imunológicas e protocolos de diagnóstico baseados em DNA. As análises imunológicas e os protocolos de diagnóstico baseados em DNA, incluem a utilização de testes FAT (do inglês *fluorescent antibody tests*), testes ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent*

*Assay*), testes RIA (do inglês *radio immuno assay*), de hibridação *in situ* (ISH), hibridação *dot blot* (DBH) e amplificação de ácidos nucleicos através da reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*, também conhecida pelo seu acrónimo - PCR) [7, 32]. As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, permitem muitas vezes a detecção direta do agente patogénico, através da amplificação do seu material genético [34].

A evolução da biologia molecular tem possibilitado o desenvolvimento de novas metodologias para identificação e examinação de doenças em aquacultura que apresentam elevada eficiência. Assim, torna-se possível não só o diagnóstico de variadas doenças que afetam peixes e moluscos, mas também a identificação de espécies e subespécies através da detecção de variações genéticas. De entre as técnicas utilizadas hoje em dia neste tipo de diagnósticos, destacam-se: a reação de PCR na amplificação de ácidos nucleicos, a digestão com enzimas de restrição, hibridação de sondas e sequenciação de nucleótidos [34].

Estas técnicas são, na sua maioria, bastante precisas, sensíveis e eficientes. No entanto, muitas requerem equipamentos laboratoriais específicos e dispendiosos a que os aquacultores nem sempre têm acesso. Há assim a necessidade de um contínuo desenvolvimento (e otimização) de técnicas de detecção que sejam pouco dispendiosas ou mesmo *kits* de detecção que possam ser facilmente operados [32].



## 3. Técnicas Moleculares

A utilização de técnicas moleculares que promovam a amplificação de ácidos nucleicos é de grande valia na biologia e biotecnologia. Estas técnicas são, amplamente utilizadas em vários campos científicos e tecnológicos (por exemplo, na biologia molecular e tecnologia de DNA recombinante). Estas são frequentemente utilizadas na detecção e análise de pequenas quantidades de ácidos nucleicos, aumentando a sensibilidade e especificidade da detecção de agentes patogénicos [32, 35, 36].

Uma das principais técnicas moleculares de amplificação de ácidos nucleicos é a reação de PCR, vastamente utilizada em todo o mundo. É uma técnica bastante versátil, comumente utilizada na detecção de agentes infecciosos através da análise de pequenas quantidades de ácidos nucleicos do agente patogénico.

Para além da técnica de PCR, tem-se promovido o desenvolvimento de uma nova geração de técnicas de amplificação molecular isotérmicas, que se destacam devido à simplicidade de operação e detecção e rapidez de reação [37, 38]. Entre estas técnicas, temos: a técnica NASBA (do inglês *nucleic acid sequence-based amplification*), a 3SR (do inglês *self-sustained sequence replication*), a SDA (do inglês *strand displacement amplification*) e o LAMP (do inglês *loop-mediated isothermal amplification*) [36]. No entanto, na maioria destas técnicas, a sua especificidade encontra-se comprometida pelo facto da amplificação ocorrer a uma temperatura relativamente baixa (cerca de 40°C). Por outro lado, necessitam muitas vezes de material bastante preciso e dispendioso para a amplificação (múltiplas enzimas e/ou reagentes específicos) ou de métodos elaborados para a detecção dos produtos amplificados. Tudo isto, faz com que a maioria destas técnicas não aparentem ser boas alternativas ao convencional método de PCR [36].

De entre as técnicas referidas, destaca-se no entanto a técnica LAMP, descoberta no ano 2000 por Notomi *et al.*, que é capaz de amplificar cerca de  $10^9$  cópias de DNA em condições isotérmicas e em menos de uma hora, sendo específica e sensível [36].

### 3.1 Gene *Toxr*

Desde 1997, variadas técnicas moleculares e protocolos baseados em DNA têm sido desenvolvidos, de modo a conseguirem promover uma rápida, e específica detecção, de cada uma das duas subespécies de *P. damselae* [14]. Ao longo dos anos têm sido desenvolvidos diferentes estudos que recorrem à utilização da técnica de PCR para detecção de diferentes genes ([17, 19, 25, 27, 39, 40]). No entanto, as diferentes metodologias desenvolvidas, apresentam no seu geral grandes desvantagens, não sendo inclusive adaptadas para a detecção das duas subespécies em amostras ambientais ([17, 19, 27, 39, 40]). Numa tentativa de desenvolver uma metodologia mais eficiente de detecção e distinção das duas subespécies em estudo, pretende-se atingir este objetivo apenas com a detecção de um gene. O gene escolhido para o efeito foi o gene *Toxr* que se encontra presente em ambas as subespécies, sendo estudadas sequências parciais deste gene que codificam uma proteína transmembranar regulatória.

As sequências parciais do gene *Toxr* são provenientes de agentes patogénicos para humanos, nomeadamente *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio hollisae*, and *Vibrio vulnificus*, e de agentes patogénicos que afetam peixes, nomeadamente *P. damsela* subsp. *damsela* e *P. damsela* subsp. *piscicida*. A sua sequenciação demonstrou que este gene se trata de um gene ancestral, uma vez que está presente em cromossomas ancestrais de toda a linhagem de *Vibrio* e de *Photobacterium*. No entanto, verificaram-se diferenças nas proteínas transcritas a partir deste gene, sendo estas mais preponderantes entre bactérias relacionadas entre si [41].

Apesar de apresentarem diferenças fenotípicas marcantes, as duas subespécies de *P. damsela* são caracterizadas pela sua difícil distinção, apresentando semelhanças globais em diferentes sequências de pares de bases de DNA do seu genoma [27]. Estas possuem uma semelhança de 100% no que toca ao gene ancestral 16S rRNA (RNA ribossomal 16S) e uma semelhança de 91% no que toca ao gene *Toxr*. As sequências obtidas a partir deste gene exibem apenas diferenças de poucos aminoácidos [41]. Este facto, faz com que a ampliação de sequências provenientes do gene *Toxr* seja viável, uma vez que estas pequenas diferenças de aminoácidos poderão promover a distinção das duas subespécies. Assim, o gene *Toxr* foi escolhido como gene alvo, funcionando como marcador filogenético, o que poderá permitir a distinção entre as duas linhagens.

## 3.2 Polymerase Chain Reaction - PCR

### 3.2.1 Conceito PCR

A reação em cadeia da polimerase, consiste numa técnica de amplificação molecular de ácidos nucleicos capaz de amplificar um simples fragmento de DNA através de elevadas ordens de magnitude. Assim, é apta a produzir milhares de cópias de uma sequência de DNA específica. A partir de uma amostra, é assim possível amplificar qualquer sequência de ácidos nucleicos de interesse, através de uma reação cíclica de amplificação onde o produto resultante se encontra pronto a ser analisado [42].

A técnica de PCR revolucionou a ciência, dando a possibilidade de detetar sequências de ácidos nucleicos tanto em isolados bacterianos como em amostras ambientais (tecidos, sangue, entre outros). Foi inicialmente descoberta nos anos 80, pelo Americano Kary Mullis, que se baseou no princípio da replicação de uma sequência de DNA, utilizando para o efeito um par de *primers* (ou iniciadores que consistem em pequenos fragmentos de DNA), um conceito descrito em 1971 por Gobind Khorana [19, 43].

Uma reação de PCR tipicamente é realizada tendo por objetivo a amplificação de uma cadeia simples ou dupla de DNA (cadeia de DNA alvo) requerendo a utilização de um par de *primers*, que hibridam nas terminações 5' e 3' da sequência alvo. Requer também uma DNA polimerase termo-estável, que promove a extensão da nova cadeia através da adição de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), dando origem a produtos de cadeia dupla. Este processo repete-se até que seja terminada a reação. As cadeias duplas de DNA obtidas são desnaturadas através do aumento de temperatura, servindo de base para as seguintes [33, 35, 36, 42, 44].

Atualmente, o PCR tornou-se numa das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos mais utilizadas na biologia molecular devido à sua versatilidade e simplicidade. Tornou-se uma técnica indispensável em diversas áreas, de pesquisa médica, engenharia genética e biológica, e as suas aplicações abrangem a possibilidade de manipulação de DNA para clonagem, investigação científica ou mesmo diagnóstico de diversas doenças [42, 44].

### 3.2.2 Reação de PCR

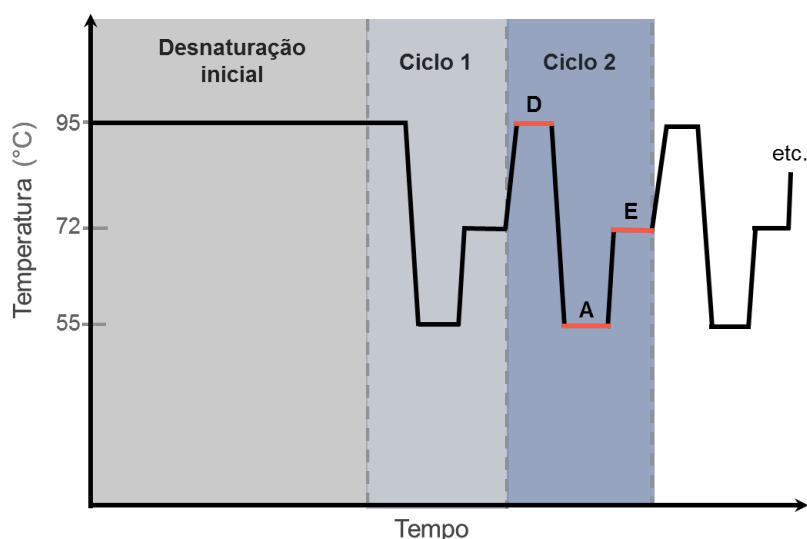
A reação de PCR é uma reação que decorre em cadeia onde, inicialmente uma molécula de DNA é utilizada para a produção de duas cópias, seguidamente quatro, seis e por aí em diante. Isto apenas é possível devido à ação de enzimas, mais precisamente as polimerases, capazes de sintetizar as novas cadeias de DNA utilizando para o efeito oligonucleóticos (adenina, timina, citosina e guanina); e de *primers* [44].

Assim, tipicamente, uma reação de PCR utiliza uma DNA polimerase e um conjunto de *primers*, que reconhecem duas zonas distintas da cadeia de DNA alvo. A reação de PCR baseia-se fundamentalmente na capacidade da DNA polimerase em sintetizar uma nova cadeia de DNA complementar à do DNA alvo. Esta, tem a capacidade de adicionar nucleóticos em grupos pré-existentes 3'-OH, necessitando para o efeito de um conjunto de *primers*, os quais se ligam ao DNA alvo flanqueando a sequência de DNA a ser amplificada, possibilitando a adição do primeiro nucleótido e iniciando a síntese da nova cadeia. Estamos assim perante uma das grandes vantagens exibidas aquando a utilização da técnica de PCR, que consiste na capacidade de decidir e delinear uma região específica da sequência de DNA alvo [42, 44]. Esta permite assim que sejam obtidas variadas cópias de uma dada cadeia de ácidos nucleicos, podendo um segmento ser amplificado de forma seletiva. A especificidade da reação encontra-se diretamente relacionada com a capacidade dos *primers* em reconhecer as sequências pretendidas no DNA alvo, podendo esta ser comprometida caso ocorra o reconhecimento ou ligação em outros locais que não sejam os pretendidos [34].

A reação de PCR pode ser caracterizada como cíclica, uma vez que para que ocorra a multiplicação do material genético são aplicados vários ciclos com etapas a diferentes temperaturas. No final de cada ciclo aplicado, temos a duplicação do material genético presente em solução. Cada um destes ciclos pode ser subdividido em três etapas, as quais se distinguem devido ao seu tempo de duração e temperatura aplicada. Assim, temos as seguintes etapas: desnaturação (do termo inglês *melting*), emparelhamento (do termo inglês *annealing*) e extensão/alongamento (Figura 2) [42, 44].

Durante a etapa de desnaturação (Figura 2), o DNA alvo de cadeia dupla é desnaturado recorrendo a elevadas temperaturas, que podem variar entre os 90 e 97°C, obtendo-se assim DNA em cadeia simples. A temperatura de desnaturação ( $T_m$ ) e o intervalo de tempo da etapa de desnaturação a serem definidos dependem tanto do comprimento como da sequência do DNA alvo. Esta etapa deve assegurar a completa separação das cadeias de DNA, uma vez que uma cadeia de DNA parcialmente desnaturada irá novamente adquirir uma estrutura em dupla hélice (devido à descida de temperatura) o que não permitirá a ligação dos *primers*, ficando assim comprometida toda a reação de amplificação [42].

Durante as etapas de emparelhamento e de extensão, ocorre a ligação dos *primers* às cadeias simples de DNA e a polimerase inicia a sua atividade, havendo a síntese de novas cadeias de DNA idênticas, e conseqüentemente a duplicação do material genético. Todo o processo de emparelhamento dos *primers* decorre numa gama de temperaturas, geralmente entre os 50-60°C (Figura 2), o que possibilita a ligação de cada um dos *primers* à sua respetiva cadeia complementar. É no local de ligação de cada *primer* que se inicia a atividade da polimerase, promovendo a extensão dos *primers* e conseqüente síntese da nova cadeia de DNA complementar (etapa de extensão/alongamento) através da incorporação dos nucleótidos disponíveis em solução. Este processo geralmente decorre a uma temperatura de aproximadamente 72°C (Figura 2), temperatura ótima para atividade da DNA polimerase [42, 44]. A temperatura da etapa de emparelhamento, também conhecida por temperatura de emparelhamento ( $T_a$ ), depende diretamente dos *primers* utilizados e conseqüentemente da sua  $T_m$ . Estes, devem assim ser desenhados de modo a possuírem  $T_m$  iguais ou semelhantes, de modo a aumentar a sua estabilidade e especificidade [42, 44].



**Figura 2** - Representação gráfica da variação da temperatura das diferentes etapas de uma reação de PCR ao longo do tempo. Inicialmente é representada a etapa da desnaturação inicial, seguindo-se os ciclos de uma reação de PCR (Ciclo 1, Ciclo 2, etc.). Cada ciclo é composto pelas seguintes etapas: Desnaturação (D), Emparelhamento (E) e Extensão (E) (adaptado de [42]).

Após a aplicação do último ciclo, geralmente a solução é incubada a uma temperatura de 72°C (durante cerca de 5 min) de modo a que ocorra o devido preenchimento das extremidades das novas cadeias de DNA sintetizadas, as quais podem ser comumente designadas por “produtos de PCR”[44]. À medida que os diferentes ciclos são conduzidos, e ocorre a repetição das etapas a cima descritas, tem-se como resultado final um aumento exponencial no número total de fragmentos de DNA [44].

Geralmente, toda a reação decorre durante cerca de duas horas, e após as diferentes etapas, os produtos obtidos podem ser visualizados (analisados) através de um gel de eletroforese, podendo também ser utilizadas enzimas de restrição, sequenciamento ou mesmo clonagem.

Para que uma reação de PCR seja bem-sucedida e sejam obtidos bons resultados, alguns cuidados devem ser tidos em consideração, nomeadamente na preparação da mistura reacional e no planeamento das condições reacionais [34].

### 3.2.3 Componentes da reação de PCR

Apesar de todas as variantes da reação de PCR existentes, uma reação de PCR básica requer a utilização de oito componentes principais necessários, para o sucesso da reação, nomeadamente: água, solução tampão (fonte de iões de magnésio), dNTPs, *primers*, sequência de DNA (alvo) a amplificar e de uma polimerase termo-estável [42, 45].

A água é extremamente necessária à reação, uma vez que trata-se da matriz onde todos os restantes componentes irão interagir. Geralmente, esta deverá encontrar-se estéril ou desionizada, uma vez que estes procedimentos de purificação eliminam a presença de contaminantes [45].

A solução tampão, geralmente fornecida concentrada (cerca de 10x) juntamente com a polimerase, tem por função principal fornecer uma concentração de sais monovalentes e pH ótimo, adequados às necessidades da enzima utilizada. Geralmente, a solução tampão contém na sua composição cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) que é responsável por fornecer à reação catiões  $Mg^{2+}$  a serem utilizados como co-factores pelas enzimas do tipo II, como é o caso das polimerases utilizadas em reações de PCR [45].

Os desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), como já referido são bases individuais de ácidos nucleicos com os quais a polimerase sintetiza as novas cadeias de DNA, sendo também conhecidos como sendo os “*building blocks*” dos ácidos nucleicos [45].

O DNA alvo a amplificar pode ser proveniente de várias fontes, podendo ser utilizado DNA puro, lisados ou misturas homogéneas moleculares. No entanto, estes embora fáceis de preparar, podem muitas vezes conter na sua composição substâncias que poderão inibir a amplificação [34]. A qualidade e quantidade do DNA alvo utilizado numa reação de PCR é de extrema importância, uma vez que será a partir deste que irá decorrer toda a reação de amplificação. Este, deverá assim encontrar-se livre de contaminantes e no estado mais puro possível, de modo a assegurar-se uma amplificação eficiente e específica. Vários métodos de preparação do DNA alvo envolvem procedimentos de extração que requerem a utilização de químicos e de tempo para serem efetuados, podendo muitas vezes serem utilizados *kits* comerciais de extração [34, 45].

A DNA polimerase termo-estável utilizada em reações de PCR é originalmente proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*. É comumente designada por Taq DNA polimerase, tratando-se de uma enzima estável a elevadas temperaturas, nomeadamente 95°C, temperatura à qual decorre a desnaturação do DNA na reação de PCR. O isolamento da Taq DNA polimerase veio ajudar na otimização da técnica de PCR, uma vez que ao mesmo tempo que se proporcionava a desnaturação do DNA ocorria também a desnaturação da enzima até à data utilizada. A temperatura ótima da Taq DNA polimerase situa-se nos 72°C, a qual lhe confere elevada atividade e estabilidade. A estabilidade da enzima utilizada é de extrema importância, uma vez que é desta que depende a estabilização do complexo polimerase-*primer* (essencial à amplificação) formado durante o decurso da reação [42, 43, 45].

Os *primers* utilizados na reação de PCR são um dos fatores mais importantes, uma vez que delimitam a região do DNA alvo a amplificar. Tanto o comprimento como a sequência do *primer*, devem ser analisadas de modo a garantir que sejam evitadas amplificações inespecíficas (ao acaso), tentando-se assegurar apenas a amplificação da zona pretendida do DNA alvo. A utilização de sequências contendo nucleótidos redundantes deve ser evitada, e o comprimento dos *primers* deverá ser suficientemente longo de modo a permitir elevadas temperaturas de emparelhamento; reduzindo-se assim os riscos de ligação e consequente amplificação inespecífica [34].

Como referido anteriormente, devido ao facto da  $T_a$  se encontrar diretamente relacionada com a  $T_m$  dos *primers* utilizados, esta deve ser devidamente estimada [42, 45]. O desenho de *primers* é hoje em dia feito recorrendo a *software* computacional específico o que possibilita o seu estudo *in silico* recorrendo à análise de variados parâmetros [46-48].

Por fim, existem disponíveis “*primers* universais” capazes de amplificar sequências de genes altamente conservadas para uma grande variedade de taxas, evitando-se assim o desenho de *primers* específicos. No entanto, a utilização deste tipo de *primers* acarreta algumas desvantagens, entre elas o risco de obtenção de “falsos positivos” muitas vezes associados à sua capacidade de ligação a uma vasta gama de bactérias ou parasitas. Quando o objetivo é a detecção de organismos patogénicos, a obtenção de “falsos positivos” pode conduzir erradamente à detecção de organismos não patogénicos [34].

### 3.2.1 Detecção de agentes patogénicos – bacterianos - PCR

A técnica de PCR é conhecida pela sua versatilidade e vasta gama de aplicações, que variam desde a sua aplicação na detecção de doenças infecciosas (VIH, pneumonia, sífilis, doenças fúngicas e causadas por protozoários, hepatite), no diagnóstico de cancros (leucemia e linfomas) até à sua utilização em testes de paternidade e impressões digitais genéticas. Esta técnica tem assim sido vastamente utilizada como ferramenta na detecção de doenças causadas por uma grande variedade de organismos, os quais incluem parasitas, fungos, vírus e bactérias [34].

No que diz respeito à utilização da técnica de PCR na detecção de bactérias causadoras de doenças em peixes, as suas aplicações são também muito variadas. A utilização da metodologia de PCR convencional, bem como outras metodologias derivadas desta, têm sido vastamente utilizadas na detecção de bactérias de bastante relevância para a aquacultura, nomeadamente: *Listonella anguillarum* [49], *A. salmonicida* [50-53], *Flavobacterium psychrophilum* [50], *Y. ruckeri* [50, 54], *Tenacibaculum maritimum* [55], *Pseudomonas anguilliseptica* [56], *Vibrio parahaemolyticus* [57], *V. vulnificus* [58], entre muitas outras.

No que toca à detecção das duas subespécies em estudo (*P. damsela* subsp. *damsela* e *P. damsela* subsp. *piscicida*) pertencentes à espécie *P. damsela*, diferentes estudos com base na metodologia de PCR têm surgido ao longo dos anos na tentativa de atingir uma metodologia de diagnóstico rápida, sensível e eficiente [17, 19, 27, 39, 40].

A detecção da subespécie *P. damsela* subsp. *piscicida* foi conseguida por diferentes autores, dos quais se pode referir o estudo de Osório *et al.* [27], que em 1999, utilizou a técnica de *nested* PCR (*nested polymerase chain reaction*) para a detecção do gene 16S rRNA. Para o efeito, utilizou 26 estirpes diferentes de *P. damsela* subsp. *piscicida*, provenientes de diferentes hospedeiros e

regiões geográficas. Com a execução deste trabalho, os autores desenvolveram um método de detecção para esta subespécie cerca de 100 vezes mais sensível do que as análises serológicas até aqui utilizadas. Neste trabalho, os autores especulam sobre a potencial capacidade do método na detecção da subespécie *P. damsela* subsp. *damsela*, no entanto, apenas conseguiram a detecção da subespécie *P. damsela* subsp. *piscicida* [27].

No ano 2000, dando continuação ao seu estudo anterior, Osório *et al.*[39] conseguiu distinguir a subespécie *P. damsela* subsp. *piscicida* de todas as outras espécies bacterianas que podem ser encontradas em peixes ou águas marítimas através da utilização da técnica de *Multiplex PCR*. Após a detecção de ambas as subespécies com o gene 16S rRNA, os autores utilizaram o gene *ureC* para detetar e distinguir as duas subespécies de *P. damsela*. Este estudo veio também comprovar que a inaptidão da subespécie *P. damsela* subsp. *piscicida* em hidrolisar a ureia (ao contrário do que se verifica na subespécie *P. damsela* subsp. *damsela*) se deve à ausência do gene *ureC* no seu genoma, e não a um mecanismo inativo existente [39]. No entanto, o método desenvolvido pelos autores recorre ao isolamento e utilização de culturas puras de cada uma das subespécies, bem como promove uma distinção baseada em evidências indiretas [19]. Isto é, a detecção de *P. damsela* subsp. *piscicida* apenas é conseguida com base na ausência de amplificação (ausência do gene *ureC*, ausência de produtos de PCR). Assim, num caso em que se verifique a presença de ambas as subespécies, não é possível promover a sua distinção utilizando esta metodologia, uma vez que a presença de *P. damsela* subsp. *damsela* conduz à obtenção de produtos de PCR (não sendo possível observar a ausência de produtos caso a espécie *P. damsela* subsp. *piscicida* esteja presente ) [19].

Em 2003, um estudo de Rajan *et al.*[40] descreve a detecção de *P. damsela* subsp. *piscicida* . A detecção desta subespécie foi feita através da técnica de PCR, promovendo a detecção do gene polissacarídeo capsular. No entanto, neste estudo a distinção das duas subespécies de *P.damsela* é feita através de uma metodologia de cultivo (em meio TCBS-1) [40].

Em 2009, um estudo de Amagliani *et al.* [17] reportou a detecção da espécie *P. damsela*, e a distinção das duas subespécies através da técnica de *multiplex PCR*. Para o efeito, os autores desenharam *primers* específicos para a detecção de uma proteína (putativa) de ligação à penicilina. No entanto, a metodologia desenvolvida exibiu falta de especificidade. De modo a contornar este problema, os autores combinaram a utilização da metodologia desenvolvida com a metodologia descrita por Osório *et al.* [39] para detecção do gene *ureC*. Tal como referido anteriormente, esta metodologia apresenta desvantagens, uma vez que não permite a distinção em simultâneo das duas subespécies.

Em 2005, Zappulli *et al.*[19] reportou a identificação da subespécie *P. damsela* subsp. *piscicida*, através da utilização das técnicas de PCR e RFLP (do inglês *Restriction fragment length polymorphism*). No seu estudo, a técnica de PCR permitiu a detecção da espécie *P. damsela*, e a técnica de RFLP possibilitou a digestão dos produtos com enzimas de restrição, por forma a distinguir as duas subespécies. No entanto, embora os autores tenham conseguido a detecção e distinção das duas subespécies de *P.damsela*, a metodologia desenvolvida não foi testada em amostras ambientais.

## 3.3 *Loop mediated isothermal amplification* – LAMP

### 3.3.1 Conceito LAMP

A técnica LAMP, descoberta no ano 2000 por Notomi *et al.* [36], tem a capacidade de amplificar ácidos nucleicos com alta sensibilidade e especificidade apresentando grande eficiência e rapidez quando operada em condições isotérmicas. As suas características rápidas e simples, distinguem-na dos testes genéticos existentes até à data [36, 59].

A reação LAMP utiliza uma DNA polimerase e quatro a seis *primers* específicos, que irão reconhecer um total de seis a oito sequências distintas do DNA alvo. Esta característica faz com que esta técnica de amplificação molecular promova uma amplificação altamente seletiva da sequência alvo, sendo capaz de amplificar grandes quantidades de DNA em menos de uma hora [36, 59]. Como referido anteriormente, a reação LAMP é caracterizada por ocorrer a temperatura constante, entre 60°C e 65°C, durante apenas cerca de 60 min [37, 38, 60]. No entanto, uma vez que a temperatura ótima da enzima geralmente utilizada (Bst DNA polimerase) é de 63°C, esta foi considerada a temperatura ótima da reação LAMP, sendo muitas vezes utilizada por diferentes autores [37, 60, 61]. Tanto a amplificação, como a detecção dos produtos podem ser levadas a cabo num simples tubo de ensaio, podendo promover-se a amplificação de fragmentos alvo de DNA bem como de RNA (Figura 3). Estas particularidades da técnica LAMP tornam-se em vantagens em comparação com a técnica de PCR, uma vez que ao se evitarem transferências de amostras evitam-se contaminações, não havendo também a necessidade de um controlo de temperatura rigoroso [36, 37, 59, 62]. A autenticação do material amplificado pode ser feita através da utilização de enzimas de restrição ou através da sequenciação dos produtos amplificados [37].

Os produtos obtidos durante a reação LAMP, apresentam uma combinação de cadeias compostas por variadas estruturas de diferentes tamanhos com múltiplos *loops*, também conhecidas por *stem-loop DNAs*. Estas cadeias são compostas por repetições invertidas dispostas alternadamente do DNA alvo [63, 64]. A partir destes produtos é possível o isolamento de fragmentos de DNA de cadeia simples. Este método foi descrito por Nagamine *et al.* [64] que conseguiu, com sucesso, o isolamento de fragmentos de DNA de cadeia simples a partir de *stem-loop DNAs* através da sua digestão a 65°C com a enzima de restrição TspRI, seguindo-se a sua purificação e terminando com a sua extensão utilizando o *primer* 5'-GACACTGGA-3' [64].

A elevada especificidade da amplificação LAMP deve-se ao facto de serem utilizados conjuntos de 4-6 *primers*, que como referido anteriormente, irão reconhecer um total de 6-8 sequências no DNA alvo, tendo a capacidade de amplificar um gene específico do genoma humano distinguindo diferenças de apenas um nucleótido. A amplificação só é conseguida se todas as sequências do DNA alvo se encontrarem disponíveis. Devido à sua elevada especificidade, a presença da sequência alvo pode ser deduzida apenas através da presença de produto amplificado [37]. Por seu lado, a elevada eficiência de amplificação demonstrada por esta técnica, com DNA a ser amplificado  $10^9$ - $10^{10}$  vezes, encontra-se associada ao facto de a reação decorrer a temperatura constante (isotérmica), não havendo perdas de tempo associadas a alterações térmicas [37].

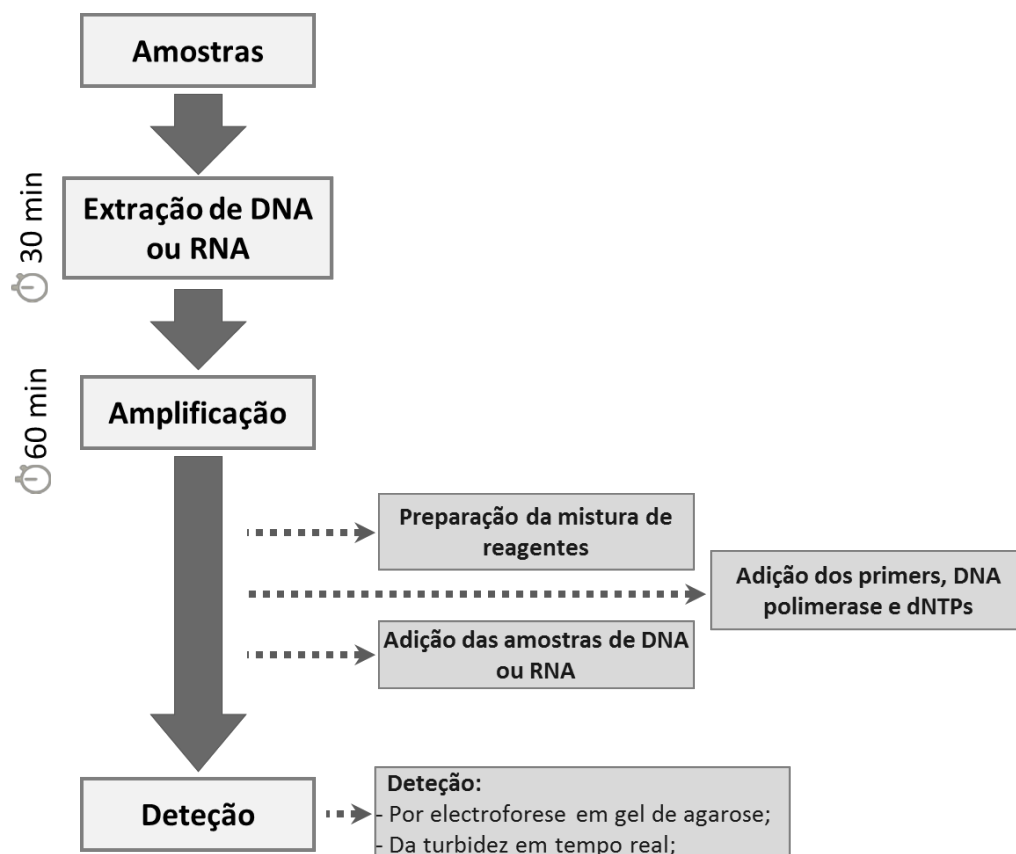


Outra vantagem da técnica de amplificação molecular LAMP, reside no facto da reação poder ocorrer à temperatura ótima da enzima utilizada, evitando-se assim reações de inibição; muitas vezes verificadas na técnica de PCR [37].

Embora, esta técnica tenha começado por ser operada utilizando uma amostra de DNA previamente desnaturada pelo calor, Nagamine *et al.* [65] demonstrou a sua eficiência sem que seja necessário este procedimento [65]. Outra particularidade desta técnica, encontra-se associada ao facto de ser possível observar os produtos amplificados a olho nu, uma vez que foi demonstrado por Mori *et al.* [38] que durante a amplificação de ácidos nucleicos, ocorre a produção de iões de pirofosfato. A produção destes iões conduz à formação de um precipitado de pirofosfato de magnésio, que origina turbidez na solução; o que torna possível a fácil monitorização do processo [37, 38].

No seu geral, a técnica LAMP apresenta características bastante favoráveis em relação a outras técnicas moleculares de amplificação de ácidos nucleicos. Os passos para amplificação LAMP são esquematizados na Figura 3: Extração do DNA ou RNA das amostras, seguindo-se a amplificação e terminando com a detecção dos produtos [63].

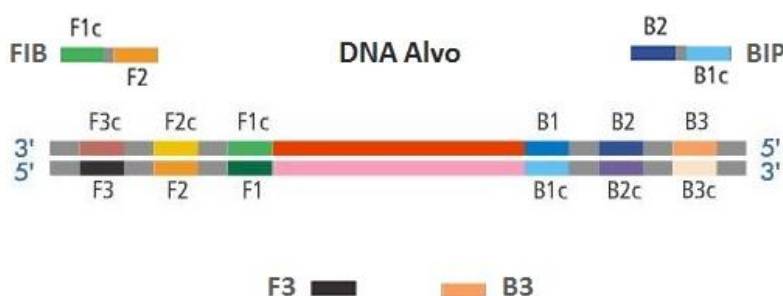
A adição de uma transcriptase reversa à mistura reacional é o suficiente para que se possa amplificar DNA a partir de amostras contendo RNA, sendo esta técnica denominada por RT-LAMP [59, 66].



**Figura 3** – Representação esquemática dos passos envolvidos na técnica LAMP (adaptado de [63]).

### 3.3.2 Desenho de *primers* para a reação LAMP

O desenho de um conjunto de *primers* altamente específicos é crucial para o sucesso de uma amplificação LAMP. Este conjunto, geralmente inclui quatro *primers*, onde dois são designados por *primers* interiores e os outros dois por *primers* exteriores [37]. Como se observa na Figura 4, os *primers* são desenhados com base em seis regiões distintas da cadeia de DNA alvo (Figura 4 – DNA Alvo, cadeia representada a vermelho), onde na posição 3', temos as regiões F3c, F2c, F1c e na posição 5' as regiões B1, B2 e B3. Estes são desenhados de modo a serem sequências complementares da cadeia alvo de DNA, pelo que 4 *primers* específicos irão ligar-se a 6 sequências distintas na cadeia alvo de DNA [37, 67].



**Figura 4** – Representação esquemática da cadeia de DNA alvo (representada a vermelho) e respetivos *primers* utilizados na técnica LAMP, nomeadamente FIB, BIP, F3 e B3. São também representadas as seis regiões distintas da cadeia de DNA alvo (F3c, F2c, F1c, B1, B2 e B3) bem como as suas respetivas regiões complementares (F3, F2, F1, B1c, B2c e B3c) (adaptado de [37]).

Os dois *primers* exteriores, designados por F3 e B3 (normalmente com um comprimento de 17-21 nucleótidos), deslocam-se em sentidos opostos ao longo da cadeia alvo de DNA, sendo o F3 o *primer* externo dianteiro e o B3 o *primer* externo traseiro. Por outro lado, os *primers* interiores, designados por FIB e BIP, são *primers* “complexos” que também se deslocam em sentidos opostos ao longo da cadeia de DNA, sendo o FIB o *primer* interno dianteiro e o BIP o *primer* interno traseiro. Os *primers* interiores são constituídos por sequências senso e antisense (complementares e não complementares) da cadeia alvo de DNA, o que irá ajudar a promover a formação das estruturas em forma de *loop* [36, 37]. O *primer* FIB é composto pelas sequências F1c e F2 (em que cada sequência normalmente tem um comprimento de 23-24 nucleótidos), onde a sequência F1c, como se pode ver na Figura 4 localiza-se na cadeia alvo, enquanto que, a sequência F2 (Figura 4) localiza-se na cadeia complementar, sendo assim a sequência complementar de F2c [36, 37].

O *primer* BIP é composto pelas sequências B2 e B1c (em que cada sequência normalmente tem um comprimento de 23 a 24 nucleótidos), onde a sequência B2 (Figura 4) encontra-se localizada na cadeia alvo de DNA. Por outro lado, a sequência B1c (Figura 4) localiza-se na cadeia complementar, sendo assim a sequência complementar de B1 [36, 37].

Existe também a possibilidade de utilização de dois *primers* adicionais designados por *loop primers* (um dianteiro e um traseiro) que têm a vantagem de acelerar a reação de amplificação, conseguindo reduzir o tempo de reação para menos de 30 min, uma vez que hibridam em locais do DNA alvo a que os *primers* internos não conseguem aceder [37, 68].

Os dois *primers* exteriores, F3 e B3, apenas são necessários durante a etapa não-cíclica da reação LAMP, ao contrário dos *primers* interiores, F1B e B1P, que são utilizados tanto na etapa não-cíclica como na etapa de amplificação cíclica da reação LAMP [37, 63].

O desenho de *primers* para uma reação LAMP, normalmente é feito recorrendo à utilização do programa PrimerExplorer, especificamente desenvolvido para o efeito [69]. O programa PrimerExplorer, orienta-se por um conjunto de fatores que tentam garantir o sucesso/eficácia do conjunto de *primers* desenhados, promovendo uma boa combinação de sensibilidade e especificidade [37]. Assim, são tidos em consideração os seguintes fatores: T<sub>m</sub>, estabilidade nas terminações de cada *primer*, percentagem em GC (GC%), formação de estruturas secundárias e distância entre *primers* [63, 67].

A T<sub>m</sub> é estimada recorrendo ao método matemático *Nearest-Neighbor*, sendo este o método de aproximação que mais perto se localiza do valor real. Uma vez que a T<sub>m</sub> é afetada tanto pela concentração de sal como pela concentração de *primers* em solução, esta é estimada sob condições experimentais fixas, nomeadamente, para uma concentração de *primers* em solução de 0,1 μM, uma concentração de íões de sódio de 50 mM e de íões de magnésio de 4 mM. Os *primers* são desenhados de modo a que entre as regiões F1c e B1c se tenha uma T<sub>m</sub> de aproximadamente 65 °C (64 a 66 °C), entre as regiões F2, B2, F3 e B3 uma T<sub>m</sub> de aproximadamente 60 °C (59 a 61 °C) e finalmente, de modo a que se tenha uma T<sub>m</sub> de aproximadamente 65 °C (64 a 66 °C) para os *primers* F1B e B1P [63, 67].

A estabilidade das terminações dos *primers* baseia-se na variação de energia livre (ΔG), sendo de extrema importância uma vez que são nestas extremidades que se dá o início da síntese de DNA. É necessário, portanto, que exista um certo grau de estabilidade. Assim, as terminações 3' de F2/B2, F3/B3 e as terminações 5' de F1c/B1c são desenhadas de modo a que apresentem uma energia livre (ΔG) de cerca de -4 kcal/mol [37, 63, 67].

A GC% é outro fator importante no desenho de *primers*, pelo que estes são desenhados de modo a que o seu teor em GC se situe entre 40% e 65% [63]. Após a inserção das sequências de DNA alvo, é calculada a percentagem de GC da sequência alvo, podendo esta ser classificada como sendo rica em AT (GC% ≤ 45) ou como sendo uma sequência rica em GC (GC% ≥ 60). Para o caso de uma sequência rica em AT, a percentagem de GC dos *primers* deverá ser de 40 a 50% e para o caso de sequências ricas em GC, a percentagem de GC dos *primers* deverá ser de 50 a 60% [37, 67].

A formação de estruturas secundárias deverá ser evitada a todo o custo, uma vez que estas podem conduzir à formação de dímeros. Para além de prevenir a formação de estruturas secundárias, também deve ser verificada tanto a complementaridade como a percentagem em GC (não podendo ser rica em AT) das regiões 3' dos *primers* desenhados. Isto porque esta complementaridade, caso se verifique, também contribui para a formação de dímeros [37, 63, 67].

A distância entre *primers* é outro fator a ser tido em conta. Os *primers* são desenhados, de modo a que entre as terminações 5' das regiões F2 e B2 se tenha uma distância de 120 a 160 bases, e entre as terminações 5' das regiões F2 e F1, uma distância de cerca de 40 a 60 pb. Finalmente, entre F2 e F3 e entre B2 e B3 deve compreender-se uma distância que pode variar entre 0 e 60 pb [63, 67].

### 3.3.3 Reação de amplificação LAMP

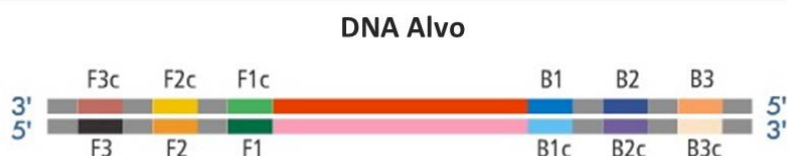
Uma reação LAMP, pode ser caracterizada como uma reação cíclica, que ocorre a temperatura constante (60-65°C), onde a atividade de um DNA polimerase é determinante no processo de amplificação. Esta reação pode, no entanto, ser dividida em duas etapas distintas, onde se considera a ocorrência de uma etapa não-cíclica e uma etapa cíclica [37, 63].

A etapa não cíclica da reação LAMP (Figura 5 - Figura 13) envolve a atuação dos 4 *primers* em simultâneo (F3, B3, FIB e BIP) e conduz à formação de uma estrutura de DNA em forma de “altere” que contém dois *loops* em cada uma das suas extremidades. Esta estrutura irá iniciar a etapa seguinte da reação LAMP, a amplificação cíclica.

A etapa de amplificação cíclica da reação LAMP (Figura 14 - Figura 18) envolve apenas a atuação dos *primers* FIB e BIP (e se for o caso dos *loop primers*) havendo a formação de cadeias de DNA compostas por várias estruturas de diferentes tamanhos que consistem em repetições invertidas e alternadas do DNA alvo.

#### 3.3.3.1 Etapa não cíclica da reação LAMP

A reação LAMP inicia-se quando o fragmento de DNA alvo (ou RNA), *primers* específicos, DNA polimerase, dNTPs e reagentes se encontram incubados a uma temperatura constante, e geralmente tem uma duração média de 45-60 min. Esquemáticamente, como se pode observar na Figura 5, a cadeia de DNA alvo é representada a vermelho, no sentido 3' para 5' [63].



**Figura 5** - DNA alvo e respetiva cadeia complementar característica da reação LAMP. São também representadas as seis regiões distintas da cadeia de DNA alvo (F3c, F2c, F1c, B1, B2 e B3) bem como as suas respetivas regiões complementares (F3, F2, F1, B1c, B2c e B3c) (adaptado de [63]). [37]).

A cadeia dupla de DNA encontra-se em solução em equilíbrio dinâmico, a temperatura constante (entre 60 e 65°C), o que permite que ocorra a ligação de um dos *primers* à sua respetiva cadeia complementar. Considerando que, inicialmente ocorre a ligação do *primers* FIB (Figura 6) à cadeia de DNA alvo, seguidamente, após a sua ligação, inicia-se a síntese de DNA através da atividade da DNA polimerase que desloca e liberta uma cadeia simples de DNA (através da adição de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs)) [63]. Forma-se então uma nova cadeia de DNA complementar à cadeia alvo, tendo esta início na extremidade 3' da região F2 do *primer* FIB, região complementar à F2c da cadeia alvo (Figura 6) [63].



**Figura 6** – Ligação do *primer* FIB à cadeia de DNA alvo e consequente síntese de uma nova cadeia de DNA (adaptado de [63]).

Seguidamente, ocorre o emparelhamento do *primer* F3 com a região F3c (região complementar), localizada na extremidade 3' do DNA alvo que não foi afetada pela síntese que ocorreu com o *primer* FIB (Figura 7) [63].



**Figura 7** – Ligação do *primer* F3 à cadeia de DNA alvo (adaptado de [63]).

Inicia-se então a síntese da nova cadeia (Figura 8), obtendo-se uma cadeia dupla de DNA através da atividade do *primer* F3, sendo libertada a cadeia complementar que foi formada após a extensão do *primer* FIB (representada a cor de rosa na Figura 8) [63].



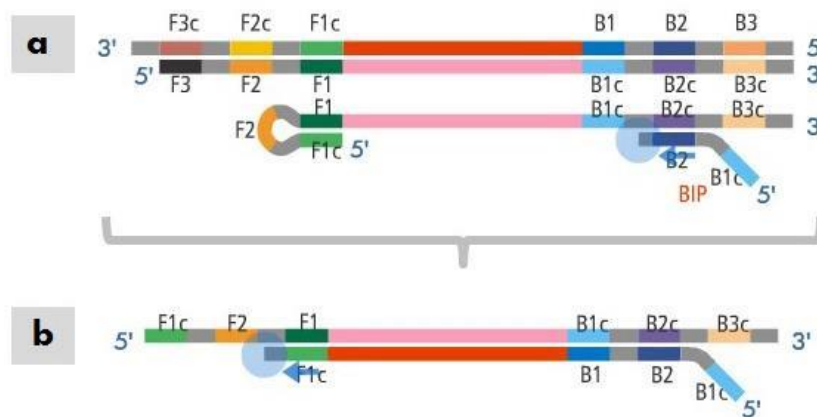
**Figura 8** – Síntese da nova cadeia de DNA e consequente libertação da cadeia anteriormente formada após a extensão do *primer* FIB (adaptado de [63]).

Como é possível observar na Figura 9, a cadeia complementar formada após a extensão do *primer* FIB, é uma cadeia de DNA simples que contém duas regiões complementares, F1 e F1c. Assim, ao haver a libertação desta cadeia, ocorre o emparelhamento destas duas regiões, o que promove a formação de um *loop* (na extremidade 5' do DNA alvo). Esta estrutura é denominada por *steam-loop* [63].



**Figura 9** – Emparelhamento das regiões complementares F1 e F1c e consequente formação do *loop* na cadeia de DNA libertada (adaptado de [63]).

Seguidamente, ocorre o emparelhamento do *primer* BIP à cadeia de DNA contendo o *loop* (Figura 10.a), e através da sua extensão é sintetizada uma nova cadeia de DNA (Figura 10.b). A formação da nova cadeia de DNA complementar tem então início na extremidade 3' da região B2 do *primer* BIP, região esta complementar à região B2c da cadeia que está a servir como molde para a síntese (Figura 10.a) [63].



**Figura 10** – a. Emparelhamento do *primer* BIP à cadeia de DNA que contém o *loop* (adaptado de [63]).  
b. Síntese da nova cadeia de DNA que tem início na região B2 do *primer* BIP (adaptado de [63]).

Tal como descrito anteriormente, de seguida ocorre a ligação de um segundo primer. Assim, ocorre o emparelhamento do primer B3 à região B3c (Figura 11), localizada na extremidade 3' da cadeia de DNA que está a servir de molde, que não foi afetada pela extensão do *primer* BIP [63].



**Figura 11** – Emparelhamento do *primer* B3 à cadeia de DNA (adaptado de [63]).

Inicia-se então a síntese de uma nova cadeia (Figura 12), sendo libertada a cadeia de DNA formada após a extensão do *primer* BIP [63].

Nesta fase, a cadeia libertada, para além de conter as regiões complementares F1 e F1c, contém também as regiões complementares B1 e B1c que, tal como as anteriores, comportam-se de forma igual, uma vez que o seu emparelhamento conduz à formação de um *loop* em cada extremidade (Figura 12) [63].



**Figura 12** – Formação de um segundo *loop* após libertação na nova cadeia de DNA (adaptado de [63]).

Obtém-se então uma estrutura em forma de “altere” que contém dois *steam-loops* em cada uma das suas extremidades (Figura 13). Como referido anteriormente, a formação destes *loops* é devida à presença das regiões complementares F1/F1c e B1/B1c que emparelham e formam este tipo de estrutura [63].

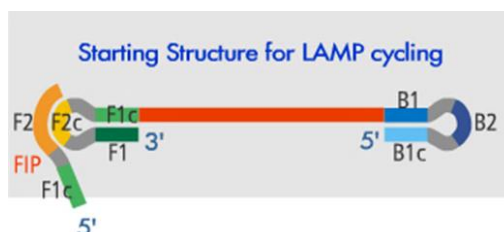


**Figura 13** – Estrutura que a partir da qual se inicia a etapa de amplificação cíclica da reação LAMP (adaptado de [63]).

Todo o processo até aqui descrito, dá origem à estrutura em forma de “altere” (Figura 13), estrutura a partir da qual se inicia a etapa da amplificação cíclica da reação LAMP [63].

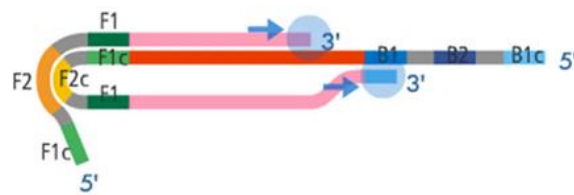
### 3.3.3.2 Etapa de amplificação cíclica da reação LAMP

Durante a etapa da amplificação cíclica da reação LAMP, apenas atuam os *primers* FIB e BIP [63]. Esquemáticamente, como se pode observar na Figura 14, ocorre o emparelhamento da região F2 do primer FIB à região F2c contida no *loop* formado pelas regiões complementares F1c e F1 [63].



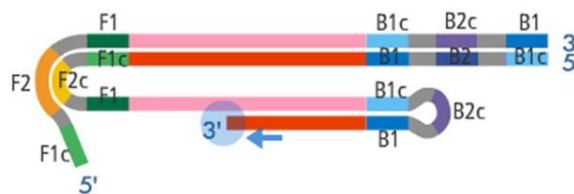
**Figura 14** – Emparelhamento do *primer* FIB ao *loop* formado pelas sequências complementares F1c e F1 devido à sua complementaridade para com a sequência F2 (adaptado de [63]).

Ao mesmo tempo que o *primer* FIB promove a síntese de uma nova cadeia de DNA, irá ocorrer a formação de uma segunda cadeia de DNA formada a partir do *loop*. Isto porque o *loop* a que o *primer* FIB se ligou é também ele um *primer* a partir do qual ocorre a síntese de uma nova cadeia do DNA, no sentido de 3' para 5' (Figura 15) [63]. A síntese destas duas novas cadeias de DNA ocorre em simultâneo, logo após a ligação do *primer* FIB à estrutura em forma de *loop* (Figura 15) [63].



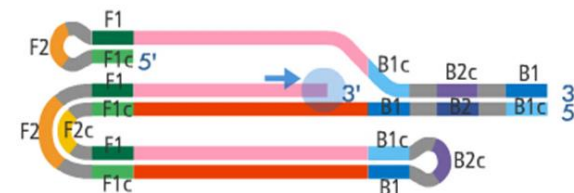
**Figura 15** – Síntese simultânea das duas novas cadeias de DNA. Uma sintetizada a partir do *primer* FIB outra sintetizada a partir das sequências que formam o *loop* (adaptado de [63]).

Após a libertação das cadeias de DNA complementares formadas no passo anterior, o *loop* formado pelas sequências complementares B1c e B1 comporta-se da maneira anteriormente descrita, iniciando a síntese de uma nova cadeia de DNA no sentido de 3' para 5' (Figura 16) [63].



**Figura 16** – Início da síntese de uma nova cadeia de DNA sintetizada a partir das sequências que formam o *loop* (adaptado de [63]).

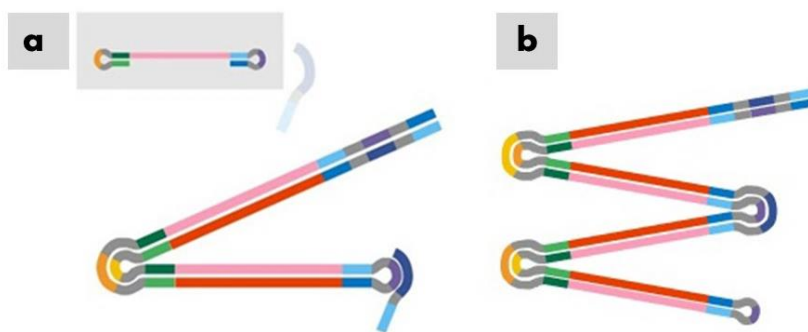
A síntese da cadeia de DNA anteriormente descrita, conduz novamente à formação e consequente libertação de uma nova estrutura em forma de “altere” (Figura 17) [63].



**Figura 17** – A síntese da nova cadeia de DNA sintetizada a partir das sequências que formam o *loop* conduz a libertação de uma nova estrutura em forma de “altere” (adaptado de [63]).

Inicia-se então uma reação cíclica, na qual ocorre a repetição consecutiva dos passos até aqui descritos[63]. Como é possível observar na Figura 18.a, o *primer* BIP irá atuar de maneira semelhante ao *primer* FIB, emparelhando com o *loop* que contém a região complementar B2c [63].





**Figura 18** – **a.** Início da síntese das novas cadeias de DNA. Uma formada a partir da estrutura em forma de altere e a outra a partir da estrutura anteriormente formada onde ocorre a ligação do *primer* BIP devido à sua complementaridade para com a região B2c localizada no *loop*. **b.** *Stem-loop DNAs* - estruturas resultantes de todo o processo de amplificação LAMP (produtos LAMP) (adaptado de [63]).

Como resultado da amplificação cíclica que ocorre (Figura 18.a), formam-se cadeias compostas por variadas estruturas de diferentes tamanhos (*stem-loop DNAs*) com múltiplos *loops*, que consistem em repetições invertidas dispostas alternadamente do DNA alvo (Figura 18.b) [63, 64].

### 3.3.3.3 Condições ótimas para a reação

Vários fatores deverão ser tidos em conta para que a amplificação através da reação LAMP seja bem-sucedida [36]. Assim algumas das condições a estabelecer são:

- Assegurar o emparelhamento dos quatro *primers* com a cadeia de DNA alvo, uma vez que este é um passo determinante para que a amplificação ocorra. Assim, os *primers* a serem utilizados devem exibir  $T_m$  específicas, de modo a otimizar as condições da reação: os *primers* F2 e B2 deveram ter uma  $T_m$  idêntica à temperatura ótima da DNA polimerase a ser utilizada; os *primers* F1c e B1c deverão ter uma  $T_m$  ligeiramente superior à dos anteriores de modo a que se promova a formação da estrutura em forma de *loop* logo a seguir à libertação da cadeia simples de DNA; a  $T_m$  dos *primers* exteriores (F3 e B3) deverá ser inferior à  $T_m$  dos *primers* interiores - de modo a garantir que a síntese levada a cabo pelos *primers* interiores ocorre primeiro do que a levada a cabo pelos exteriores; a concentração dos *primers* exteriores deverá ser inferior à concentração dos *primers* interiores (entre 1/4 e 1/10 da concentração) [36];
- A formação da estrutura precursora em forma de “altere” é fundamental para que a segunda etapa da reação LAMP (amplificação cíclica) possa ter início [36];
- A eficiência da amplificação está dependente do comprimento da cadeia de DNA alvo, pelo que, esta não deve ultrapassar os 300 pb [36];
- Deve haver uma seleção cuidada da polimerase a ser utilizada [36];
- Assegurar a presença de alguns químicos desestabilizadores em solução, nomeadamente betaina (do inglês *N,N,N - trimethylglycine*) ou L-proline. Estes, destabilizam a hélix de

DNA aumentando a eficiência de amplificação. Estes químicos demonstraram também que promovem um aumento da seletividade em relação ao DNA alvo, reduzindo a amplificação de sequências irrelevantes [36];

### 3.3.4 Visualização dos produtos LAMP

Existem vários métodos de detecção que podem ser aplicados para a visualização dos produtos resultantes da amplificação LAMP [32, 36]. Normalmente a visualização dos produtos é feita recorrendo à electroforese em gel de agarose utilizando um agente intercalante fluorescente como marcador, como é o caso do brometo de etídio ou do *SYBR Green I*. O corante *SYBR Green I*, trata-se de uma cianina assimétrica que se liga ao DNA formando um complexo que absorve na zona da luz azul ( $\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$ ) do espectro eletromagnético e emite luz verde ( $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$ ) [32, 37]. Outra forma de visualizar as elevadas quantidades de produto amplificado recorre à utilização de um transiluminador de UV. Para tal, à solução é adicionado um agente intercalante fluorescente seguindo-se a observação sob luz UV ( $\lambda = 302 \text{ nm}$ ). Para o caso do corante *SYBR Green I*, na presença de uma amplificação positiva, este sofre uma mudança de cor de laranja para verde [32, 36, 37].

Como já foi referido previamente, outra das particularidades desta técnica deve-se ao facto da visualização dos produtos amplificados poder ser feita a olho nu. Isto é devido à formação de iões de pirofosfato de magnésio que formam um precipitado branco. As elevadas quantidades de DNA amplificado permitem assim a detecção de turbidez na solução, uma vez que após centrifugação irá obter-se um acumular deste precipitado de cor branco no fundo do tubo [32, 38].

### 3.3.5 Detecção de agentes patogénicos – bacterianos - LAMP

A detecção de isolados bacterianos de humanos, de ambientes aquáticos e de peixes, tem-se vindo a diversificar desde a descoberta desta técnica. A técnica LAMP, tem sido utilizada para a detecção de variados agentes patogénicos, numa tentativa de promover uma ferramenta de diagnóstico rápida, pouco dispendiosa e simples [32].

A primeira aplicação da técnica LAMP para a detecção de isolados bacterianos ocorreu no ano 2003 e foi levada a cabo por Maruyama *et al.*[70]; a técnica foi então utilizada para detecção do gene *stxA<sub>2</sub>* de células de *Escherichia coli* (proveniente de um ambiente costeiro). Com a execução deste trabalho, os autores puderam observar que a utilização *in situ* da técnica LAMP revelou vantagens quando comparada com a técnica de PCR, nomeadamente, puderam verificar que o facto da reacção LAMP ser levada a cabo a uma temperatura constante não provocava tantos danos celulares. Os autores também observaram a obtenção de quantidades bastante elevadas de DNA amplificado, e que o produto LAMP obtido continha cadeias de DNA numa forma não existente em células bacterianas o que facilitou a detecção utilizando uma simples sonda de ácidos nucleicos [32, 70]. Para além disto, a técnica LAMP foi também utilizada na detecção de outras bactérias tais como: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [71], *Mycobacterium tuberculosis*

*complex*, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* [72], estirpes de *Staphylococcus aureus* [73] resistentes à metilina, *Salmonella* [74], entre outras.

No que toca à detecção de agentes patogénicos causadores de doenças em peixes, a técnica LAMP tem sido também vastamente aplicada, a fim de proporcionar uma ferramenta de diagnóstico [32]. A técnica LAMP foi pela primeira vez utilizada para detecção da doença *Edwardsiellosis* por Savan *et al.* em 2004 [75]. A *Edwardsiellosis* é uma doença que afeta peixes, sendo causada pela bactéria *Edwardsiella tarda* encontrada em espécies de solha-japonesa (*Hippoglossoides elassodon*). Esta bactéria é conhecida devido aos seus efeitos nefastos em sistemas de aquacultura e devida à sua patogenicidade em humanos. Durante este trabalho, os autores testaram a especificidade da técnica LAMP utilizando cinco estirpes diferentes de *Edwardsiella tarda*, chegando à conclusão de que a amplificação desta técnica era extremamente específica, sendo mais sensível do que a técnica de PCR utilizada [32, 75]. Para além disto, a técnica LAMP tem vindo a ser aplicada na detecção várias bactérias responsáveis por causar doenças em peixes, nomeadamente: *Edwardsiella ictaluri* [76], *Nocardia seriolae* [61], *V. parahaemolyticus* [77], *A. salmonicida* [78], entre outras. Até à data, ainda não existem trabalhos disponíveis que indiquem a utilização da técnica LAMP para a detecção das duas subespécies de *P. damsela*. A técnica LAMP também tem vindo a demonstrar ser bastante eficaz na detecção de vírus, e na detecção de infeções fúngicas e parasíticas [32].

### 3.4 Vantagens e Desvantagens

Apesar do seu grande potencial, as técnicas de diagnóstico baseadas em protocolos de DNA utilizadas em aquacultura, apresentam tanto vantagens como limitações [7]. Embora estas técnicas no seu geral sejam bastante sensíveis e permitam a detecção do DNA alvo mesmo quando disponível em pequenas quantidades, a partir dos resultados positivos obtidos, a informação quantitativa disponibilizada não permite inferir corretamente sobre o nível da infeção [7]. Os “falsos positivos” e os “falsos negativos” são outro grande problema encontrado aquando da utilização deste tipo de técnicas moleculares. Têm muitas vezes origem na escolha inapropriada da amostra a analisar, na má seleção do procedimento de extração de DNA a aplicar ou mesmo na baixa concentração do agente patogénico na amostra populacional utilizada [7, 34].

No que toca às técnicas de PCR e LAMP, ambas apresentam vantagens e desvantagens, que devem ser cuidadosamente tidas em conta aquando da decisão da sua utilização como método de amplificação de ácidos nucleicos.

No que toca às vantagens apresentadas pela técnica de PCR, algumas que se podem referir são:

- Vastamente utilizada como ferramenta de diagnóstico molecular (por exemplo no diagnóstico de doenças malignas – linfomas e leucemia; e em variadas análises) [37];
- Promove diagnósticos precoces [37];
- Extremamente sensível, sendo possível em certos casos a amplificação de uma simples molécula de DNA [79];
- Técnica que permite a amplificação de material genómico de organismos viáveis, não viáveis e viáveis mas não cultiváveis [79].

No entanto, a técnica de PCR apresenta também algumas desvantagens, nomeadamente:

- Necessidade de material laboratorial sofisticado e dispendioso, tanto para a amplificação (termociclador) como para a detecção dos produtos amplificados [33, 35, 36];
- Redução ou completa inibição da eficiência de amplificação (“falsos negativos”), devido à presença de uma vasta gama de inibidores, (que tanto podem ser substâncias orgânicas como inorgânicas, nomeadamente detergentes, antibióticos, compostos fenólicos, enzimas, polissacarídeos, gorduras, proteínas e sais), eficiência das diferentes DNA polimerases ou performance do termociclador utilizado [17, 37];
- Necessidade de uma preparação de amostras extensiva que garanta a eliminação de inibidores [37];
- Limitações impostas pelo comprimento e conhecimento prévio da região a amplificar;
- Duração de 3 a 4 h [37];
- Difícil otimização [79].

O desenvolvimento de técnicas de RT-PCR, também conhecida por PCR quantitativo em tempo real (do inglês *real-time polymerase chain reaction*), consiste numa evolução da técnica de PCR convencional que tem por objetivo minimizar algumas das desvantagens e limitações da técnica de PCR através da quantificação e amplificação simultânea de DNA. Resumidamente, a técnica RT-PCR baseia-se na detecção e quantificação de um composto fluorescente, partindo do princípio de que o aumento significativo da quantidade de produto está correlacionado com a quantidade inicial do controlo. Esta técnica vem contornar algumas das desvantagens apresentadas pela técnica de PCR tradicional: a amplificação pode ser controlada em tempo real, o risco de contaminação é bastante mais baixo, uma vez que não existe a necessidade de processamento dos produtos resultantes, requer uma menor quantidade de material genético e a recolha de dados ocorre durante a fase exponencial de crescimento da reação de PCR, sendo no seu geral uma técnica mais específica e sensível [37].

Contudo, ambas as técnicas referidas (PCR e RT-PCR) apresentam desvantagens, uma vez que, ou necessitam de material laboratorial específico e dispendioso para a amplificação, ou necessitam de métodos elaborados e complexos para visualização dos produtos amplificados [37].

No que toca à técnica de amplificação molecular LAMP, algumas das suas principais vantagens são:

- Amplificação altamente seletiva (específica) do fragmento de DNA alvo, uma vez que utiliza 4-6 *primers* que reconhecem 6-8 sequências distintas da região alvo a amplificar [36, 59];
- Amplificação pode ser feita recorrendo à utilização de um banho quente ou num bloco de aquecimento [37];
- Elevada eficiência de amplificação e sensibilidade [37];
- Possibilidade de monitorização dos produtos em tempo real (a olho nu) através do aparecimento de turbidez na solução [37, 38];
- Operada a temperatura constante, não necessitando de um controlo de temperatura rigoroso [37];

- Não exige a desnaturação prévia do DNA alvo a amplificar [65];
- Duração de 1-2h no máximo [37].

No entanto, apesar de todas as vantagens previamente descritas, a técnica LAMP apresenta também desvantagens, nomeadamente:

- Desenho de *primers* extremamente complexo, uma vez que requer a utilização de um conjunto mínimo de 4 *primers* [37];
- Eventual restrição geográfica dos reagentes [37];
- A sua elevada sensibilidade torna-a suscetível à obtenção de “falsos positivos” devido a contaminações [32].

As duas metodologias de amplificação de ácidos nucleicos descritas são bastante distintas, apresentando vantagens, desvantagens e propriedades bastante diferentes, que deverão ser cuidadosamente analisadas antes da sua utilização. A Tabela 2 apresenta um resumo das propriedades de cada uma das referidas técnicas, PCR e LAMP.

**Tabela 2** – Propriedades características das técnicas de amplificação molecular PCR e LAMP (adaptado de [35]).

Propriedade	PCR	LAMP
<b>Amplificação DNA</b>		Sim
<b>Amplificação RNA</b>		Sim
<b>Enzima utilizada</b>	Taq Polimerase	Bst DNA Polimerase
	94	
<b>Temperaturas (°C)</b>	55-60	60-65
	72	
<b>Desenho de <i>primers</i></b>	Simples	Complexo
<b>Capacidade de amplificação múltipla</b>	Sim	Não
<b>Método de deteção dos produtos</b>	Gel de eletroforese, ELISA, <i>Real-time</i>	Gel de eletroforese, turbidez, <i>Real-time</i>
<b>Tolerância a compostos biológicos</b>	Não	Sim
<b>Necessidade de desnaturação do DNA alvo</b>	Sim	Não
<b>Agente desnaturante</b>	Calor	Betaína



## 4. Objetivos

- Desenho de *primers* específicos para detecção de sequências do gene *Toxr*, para identificação e distinção das subespécies de *P. damsela*: *P. damsela* subsp. *damsela* e *P. damsela* subsp. *piscicida*;
- Utilização das técnicas de LAMP e PCR para amplificação do gene *Toxr*, das duas subespécies *P. damsela* subsp. *damsela* e *P. damsela* subsp. *piscicida*;
- Discriminação das duas subespécies utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, DGGE).





## 5. Materiais e Métodos

No presente estudo, os *primers* utilizados nas reações de amplificação, LAMP (Tabela 3 e Tabela 5) e PCR (Tabela 7), foram sintetizados pela empresa IBA (IBA - *Solutions for life Science*, Göttingen, Alemanha).

O DNA puro das estirpes bacterianas utilizadas no presente estudo (*P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela* e *V. parahaemolyticus*), foi obtido na empresa DSMZ (Leibniz Institute DSMZ - *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, Braunschweig, Alemanha). De modo a rentabilizar o DNA obtido, este foi amplificado utilizando o kit *GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Para confirmação dos produtos obtidos com o kit, foi feita uma nova amplificação utilizando a técnica de PCR e a visualização dos produtos foi feita através da técnica de DGGE.

As amostras ambientais utilizadas para a realização dos diferentes testes (ponto 5.2.3), são provenientes de uma aquacultura com sistema de recirculação de água com produção linguado (*Solea senegalensis*) e de pregado (*Scophthalmus maximus*) [80]. A sua recolha e tratamento foram previamente feitos, sendo estas recolhidas, transportadas para o laboratório e filtradas com uma membrana de 0,22 µm [80]. Posteriormente, procedeu-se à extração do seu DNA utilizando o kit *E.Z.N.A. Soil DNA extraction kit* (Omega Bio-Tek, USA) [80]. Estas amostras foram analisadas recorrendo a duas técnicas, o DGGE e a pirosequenciação. Enquanto que, a técnica de DGGE permitiu uma análise geral destas amostras, a pirosequenciação permitiu uma caracterização mais aprofundada das comunidades microbianas das amostras em estudo [80]. No presente trabalho, a seleção das amostras ambientais a utilizar foi feita com base no resultado de pirosequenciação (Biocant, Cantanhede, Portugal) [80].

### 5.1 LAMP

#### 5.1.1 Desenho de *primers*

Neste trabalho, o desenho dos diferentes conjuntos de *primers* específicos foi levado a cabo por duas metodologias diferentes, através da utilização do programa PrimerExplorer [69] e manualmente utilizando os programas MEGA [48] e Oligo (*Oligo - Primer Analysis Software*) [47]. O PrimerExplorer [69] é um programa concebido especificamente para o desenho de *primers* em função das sequências de interesse para a reação LAMP [81]. Este programa permite a seleção de uma região específica da sequência fornecida, possibilitando a escolha de uma região alvo para o desenho dos *primers* F3, B3, FIB e BIP. O programa Oligo [47], por sua vez é uma ferramenta concebida para análise de sequências e de *primers* para PCR, genes sintéticos e para vários tipos de sondas [46]. Este possibilita a análise de *primers* previamente desenhados, tendo por base alguns dos parâmetros anteriormente descritos, nomeadamente: análise da Tm e composição de cada *primer*, possibilidade de formação de estruturas secundárias indesejáveis, GC%, estabilidade das terminações de cada *primer* e respetiva estabilidade interna [47]. A ferramenta MEGA [48],

por seu lado, tem uma vasta gama de aplicações, permitindo: o alinhamento de sequências, o desenho de árvores filogenéticas, extração de informação de bases de dados *on-line*, inferir sobre sequências ancestrais, testar hipóteses evolucionárias, entre outras. No presente trabalho, esta ferramenta foi utilizada para o alinhamento de sequências, obtenção de regiões consenso e para o desenho de *primers*.

Inicialmente, foi necessária a pesquisa das sequências de interesse do gene alvo, o seu alinhamento e a determinação da sua região consenso. Assim, todas as sequências parciais do gene *Toxr* das duas subespécies de *P. damsela* (21 sequências) foram importadas da base de dados GenBank [82] e alinhadas. O desenho de *primers* específicos para cada uma das subespécies em estudo foi realizado a partir de cada uma das regiões consenso obtidas utilizando o programa MEGA.

Para cada uma das subespécies, o programa PrimerExplorer permitiu o desenho de diferentes conjuntos de *primers*, onde foi possível definir manualmente a região B2 contida na região alvo a amplificar. Esta região foi definida de modo a que os conjuntos de *primers* obtidos promovessem a amplificação das zonas de maior variabilidade entre as duas subespécies estudadas (zonas com as maiores diferenças de nucleótidos). Os diferentes conjuntos de *primers* obtidos foram novamente analisados e comparados entre si utilizando o programa Oligo, de acordo com os parâmetros anteriormente descritos (ponto 3.3.2), sendo selecionado o melhor conjunto para cada uma das duas subespécies.

Os *primers* desenhados manualmente (utilizando o programa MEGA), foram desenhados segundo o mesmo princípio dos *primers* obtidos com o PrimerExplorer. Assim, foi definida uma região B2 de forma a amplificar as zonas que apresentavam maior variabilidade. Tal como anteriormente, os *primers* obtidos foram posteriormente analisados com o programa Oligo.

Foram obtidos, portanto, quatro conjuntos de *primers* (dois para cada subespécie) que apresentam uma boa combinação de sensibilidade e especificidade *in silico* (exibidos na Tabela 3).

**Tabela 3** – Conjuntos de *primers* obtidos para a reação LAMP para cada uma das subespécies em estudo.

		Sequência (5' - 3')			
		<i>Primer</i>	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	<i>Primer</i>	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
Desenhados manualmente	Pi_F3s		CKYGCGCTCACTTTTATCC	Da_F3s	CTCGCGCTCACTCTTATCT
	Pi_B3s		TTTCTTGCTGGTGGTTATTC	Da_B3s	TCTCCTGCTGGTGGTTATCT
	Pi_FIBs		GAATAAAAATTGTCAGAAGCTTTTGCA GGCATTATTGATCCCTCTT	Da_FIBs	GGAATAAAAATTGTCAGAAGCTTTTG- TRGCATTATTGATCCCTCTG
	Pi_BIPs		TGTAACGCCAAATAACAATCCATATA CAGGTTGAAATTAGGTTCTG	Da_BIPs	AGTTGTAACACCAAATAACAACCCCT- GATACAGGTCGAAATGAGGC
	Pi_F3p		CAACAGCCTATAAGCACAGAG	Da_F3p	AAACGCCTATAAGCACAGAA
	Pi_B3p		GTTCTGCCAATCATTATAATT	Da_B3p	AGAGGCTCTGCCAATCG
	Pi_FIBp		GCTGGTGCAAAGTAACTTGCA- TTTTATCCATTATCGCTTTAATC	Da_FIBp	GCTGGTGCAAAGTAACTTGCC- ACTCTTATCTATYATCGCTTTGATA
	Pi_BIPp		TTCTGACAATTTTATCCACTCTTTT- GATTGTTATTTGGCGTTACG	Da_BIPp	TTCTGACAATTTTATCCACTCTTTT- GGGTTGTTATTTGGTGTACA
Desenhados com o PrimerExplorer	Pi_F3p		AAGTTCGGCAAAGGTCAC	Da_F3p	AAGTTCGGCAARGGT MAYH
	Pi_B3p		ACAGGTTGAAATTAGGT	Da_B3p	ACAGGTCGAAATGAGGCT
	Pi_FIBp		CAAAGTAACTTGCAAAGGGAT- GCTCACTTTTATCCATTATCGC	Da_FIBp	CAAAGTAACTTGCCAGAGGGAT- GCTCACTTTTATCTATYATCGC
	Pi_BIPp		TATTCCACTCTTTTCGGTTAARGGG- GCCAATCATTATAATTGGA	Da_BIPp	TATTCCACTCTTTTCGGTTAARGGG- GCCAATCGTTCATAATAGGG

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de obter *primers* o mais específicos possível, capazes de amplificar as sequências do gene *Toxr* de ambas as subespécies de *P. damsela*.

### 5.1.2 Testes de detecção das subespécies de *Photobacterium damsela*

Na tentativa de realizar uma reação LAMP, foram realizados diferentes ensaios utilizando os *primers* obtidos (Tabela 4), DNA puro de ambas as subespécies de *P. damsela* e reagentes (de acordo com a Tabela 4). As reações foram realizadas num termociclador (96 Well Thermal Cycler, Veriti, Applied Biosystems) durante 60 min a 63°C.

Foi também estudada a utilização de DNA desnaturado e não desnaturado, de diferentes temperaturas (gradiente 60°C a 65°C) e tempos reacionais (60 min e 120 min). A desnaturação do DNA foi realizada num termociclador, incubando a mistura reacional a 95°C durante 5 min, sendo posteriormente arrefecida em gelo.

**Tabela 4** – Reagentes e respectivos volumes e concentrações utilizados nas reações LAMP (testes).

Reagente	Concentração	Volume (µL)
FIB e BIP	$1,6 \times 10^{-6}$ M	8,0
B3 e F3	$0,2 \times 10^{-6}$ M	2,0
dNTPs <sup>(1)</sup>	$1,4 \times 10^{-3}$ M	3,5
Betaína <sup>(1)</sup>	0,8 M	4,0
Bst DNA polimerase <sup>(1)</sup>	8 U	1,0
Tampão	1:10	2,5
Água		2,0
DNA alvo		2,0
<b>Volume total por reação</b>		<b>25,0</b>

(1) **Empresas fornecedoras dos reagentes:** BIORON - *Smart Molecular Solutions*, Ludwigshafen, Germany (dNTPs); Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (Betaína); GeneON, Ludwigshafen, Germany (Bst DNA polimerase).

### 5.1.3 Testes para detecção de *Vibrio parahaemolyticus*

De modo a funcionar como reação controlo, foram realizados diferentes ensaios para a detecção de *V. parahaemolyticus* de acordo com o protocolo experimental descrito por Chen *et al.* [77], utilizando os *primers* descritos na Tabela 5.

**Tabela 5** – Conjunto de *primers* utilizados por Chen *et al.*[77] para detecção de *V. parahaemolyticus* com a técnica LAMP.

Sequência (5' - 3')	
Primer	<i>V. parahaemolyticus</i>
Vi_F3	TTGGATTCCACGCGTTAT
Vi_B3	CGTTCAATGCACTGCTCA
Vi_FIB	TGAGATTCCGCAGGGTTTGTAATTTTGGCACTATTACTACCG
Vi_BIP	GTTCCGTCAGATTGGTGAGTATC-TAGAAGGCAACCAGTTGTT
Vi_Loop	AGAACGTACCAGTGATGACACC

Estas reações foram realizadas num termociclador durante 60 min a 63°C, terminando a reação a 80°C durante 5 min, utilizando os reagentes exibidos na Tabela 6.

**Tabela 6** - Reagentes e respetivos volumes e concentrações utilizados nas reações LAMP para detecção de *V. parahaemolyticus*, apresentados por Chen *et al* [77].

Reagente	Concentração	Volume (µL)
Vi_FIB e Vi_BIP	$1,6 \times 10^{-6}$ M	8,0
Vi_B3 e Vi_F3	$0,2 \times 10^{-6}$ M	2,0
Vi_Loop	$0,8 \times 10^{-6}$ M	2,0
dNTPs	$1,4 \times 10^{-3}$ M	3,5
Betaína	0,8 M	4,0
Bst DNA polimerase	8 U	1,0
Tampão	1:10	2,5
DNA alvo		2,0
<b>Volume total por reação</b>		<b>25,0</b>

## 5.2 PCR

A segunda parte do trabalho desenvolvido pretende dar continuidade a um estudo iniciado no Laboratório de Estudos Moleculares de Ambientes Marinhos (LEMAM) pelo Rafael Navarro [83] durante a sua tese de mestrado e financiado pelo projeto *Aquasafe*. Durante o seu trabalho, foram desenhados e analisados dois conjuntos de *primers* que visam a detecção e distinção das duas subespécies de *P. damsela*. No entanto, embora tenham sido obtidos *primers* que *in silico* apresentam características promissoras, não foram obtidos resultados de amplificação positivos. Devido às promissoras características dos *primers*, no presente trabalho estes foram novamente testados num procedimento que envolve a utilização de duas reações de PCR (*nested* PCR). A detecção das subespécies em estudo através da técnica de PCR visa a amplificação de sequências do gene *Toxr*.

### 5.2.1 Metodologia geral e *primers*

Nesta parte do trabalho desenvolvido, a amplificação das amostras foi realizada através de duas reações de PCR distintas denominadas por 1ºPCR e 2ºPCR.

No 1ºPCR foram utilizados os *primers* Toxrn1-F (1 de 1ºPCR e F de *Forward*) e Toxrn1-R (1 de 1ºPCR e R de *Reverse*) com 23 pb e 24 pb (exibidos na Tabela 7), respetivamente, e  $T_m$  entre 58,3°C e 61,1°C, gerando produtos com 300 pb. No 2ºPCR foram utilizados os *primers* Toxrn2-GC-F (2 de 2ºPCR, GC de *GC clamp* e F de *Forward*) e Toxrn2-R (2 de 2ºPCR e R de *Reverse*) com 62 pb e 25 pb (exibidos na Tabela 7), respetivamente, e  $T_m$  entre 59,5°C e 60,1°C, gerando produtos com 323 pb. Todas as reações de PCR foram realizadas num termociclador (96 Well Thermal Cycler, Veriti, Applied Biosystems).

Uma sequência rica em guaninas e citosinas, denominada por GC-clamp, foi inserida na extremidade 5' do *primer* Toxrn2-F de modo a que, após a amplificação com o segundo conjunto

de *primers* (no 2ºPCR), ocorresse a sua inserção nos produtos obtidos. A sua inserção faz-se geralmente quando se pretende realizar um DGGE, uma vez que é uma sequência rica em GC e evita a completa dissociação do DNA em cadeias simples [84]. Em certos casos, a inserção destas sequências aumenta a especificidade de detecção da técnica de DGGE; sendo, desta forma, fundamental na resolução de fragmentos de DNA de tamanho semelhante mas que apresentam sequências diferentes [85]. Nas condições certas, a inserção destas sequências pode aumentar a capacidade de detecção de pequenas diferenças de nucleótidos entre os fragmentos de DNA até próximo dos 100% [85].

**Tabela 7** – Sequências de nucleótidos dos dois conjuntos de *primers* utilizados durante as reações de PCR [83].

Sequência (5' - 3')	
Primer	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> e <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
Toxrn1-F	GGCTATTRCAGCAACGGAACACG
Toxrn1-R	TTTGGYGTTACRACCTGCACCCCT
Toxrn2-GC-F	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGCAGCAACGGAACACGCAGAAGA
Toxrn2-R	TGCACCCCTTAACCGAAAAGAGTG

Cada uma das reações de PCR (1ºPCR e 2ºPCR) é realizada utilizando um programa de amplificação específico que inclui a utilização de temperaturas e tempos específicos em cada uma das seguintes etapas: desnaturação inicial, desnaturação, emparelhamento, extensão e extensão final (Tabela 8).

No presente trabalho, todas as reações de amplificação foram realizadas de acordo com o programa de amplificação (geral) exibido na Tabela 8. As temperaturas de emparelhamento (Ta1 e Ta2), representadas na Tabela 8, não apresentam um valor fixo uma vez que o seu valor varia ao longo dos testes desenvolvidos, sendo inclusive realizada a sua otimização em duas ocasiões.

**Tabela 8** - Programas de amplificação (gerais) utilizados na realização do *nested* PCR. Onde Ta1 e Ta2 são variáveis que representam as temperaturas de emparelhamento utilizadas no 1ºPCR e 2ºPCR, respetivamente.

Etapa de amplificação	Nested PCR	
	1ºPCR	2ºPCR
Desnaturação inicial	94°C, 5 min	95°C, 10 min
Desnaturação	94°C, 45 s	94°C, 45 s
Emparelhamento	Ta1, 45 s	Ta2, 45 s
Extensão	72°C, 90 s	72°C, 60 s
Extensão final	72°C, 10 min	72°C, 10 min

} × 35 ciclos

Para cada PCR foi sempre realizado um controlo positivo e um negativo. Em casos de resultados de amplificação negativa, o controlo positivo assegura o sucesso da reação de amplificação, enquanto o controlo negativo permite fazer o despiste de potenciais contaminações.

## 5.2.2 Teste dos *primers* e otimização da temperatura de emparelhamento

De modo a testar o funcionamento dos *primers* e otimizar a  $T_a$  de cada uma das reações de 1ºPCR e 2ºPCR ( $T_{a1}$  e  $T_{a2}$ ), foi testada a amplificação de *P. damsela* subsp. *damsela* a diferentes temperaturas: 52°C, 53°C, 58°C, 59°C, 60°C e 61°C (Tabela 9); usando os reagentes e os *primers* descritos na Tabela 10.

**Tabela 9** – Programas de amplificação utilizados na realização do 1ºPCR e 2ºPCR, adaptado para a realização de reações a diferentes temperaturas de emparelhamento – 52°C, 53°C, 58°C, 59°C, 60°C e 61°C.

Etapa de Amplificação	Nested PCR	
	1ºPCR	2ºPCR
Desnaturação Inicial	94°C, 5 min	95°C, 10 min
Desnaturação	94°C, 45 s	94°C, 45 s
Emparelhamento	52°C	52°C
	53°C	53°C
	58°C	58°C
	59°C	59°C
	60°C	60°C
	61°C	61°C
	45 s	45 s
Extensão	72°C, 90 s	72°C, 60 s
Extensão Final	72°C, 10 min	72°C, 10 min

} × 35 Ciclos

**Tabela 10** – Reagentes e respetivos volumes e concentrações utilizados no 1ºPCR e 2ºPCR para o teste de diferentes temperaturas de emparelhamento dos *primers*.

Reagentes	Concentração	Volume (µL)	
		1ºPCR	2ºPCR
Água		10,0	8,5
DNA		1,0	1,0
Dream Taq PCR Master Mix <sup>(1),(2)</sup>	2×	12,5	12,5
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> ) <sup>(2)</sup>	2 mg/ml	1,0	
Toxrn1-F	10 × 10 <sup>-6</sup> M	0,25	
Toxrn1-R	10 × 10 <sup>-6</sup> M	0,25	
Acetamida <sup>(2)</sup>	500 mg/ml		2,0
Toxrn2-GC-F	10 × 10 <sup>-6</sup> M		0,5
Toxrn2-R	10 × 10 <sup>-6</sup> M		0,5
<b>Volume total por reação</b>		<b>25,0</b>	<b>25,0</b>

(1) **DreamTaq PCR Master Mix** (2x), contendo: Dream Taq DNA polymerase, Dream Taq buffer (otimizado), MgCl<sub>2</sub> e dNTPs.

(2) **Empresas fornecedoras dos reagentes:** Fermentas, *Molecular Biology Products*, Vilnius, Lithuania (DreamTaq PCR Master Mix); Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (BSA); Fluka (Sigma-Aldrich), St. Gallen, Suíça (Acetamida).

Depois de comprovado o funcionamento dos *primers* e de selecionada uma Ta de 61°C, testou-se a eficiência dos mesmos através da amplificação de DNA puro de *P. damsela* subsp. *damsela* e de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Conjuntamente foram realizados mais dois testes preliminares avaliando a sensibilidade dos *primers* através da amplificação de *Vibrio salmonicida* e a detecção da espécie *P. damsela* em amostras ambientais.

Posteriormente, de modo a testar a sensibilidade do primeiro conjunto de *primers*, foi realizada a amplificação de 8 espécies (estirpes) bacterianas diferentes, nomeadamente: *A. salmonicida*, *V. parahaemolyticus*, *V. salmonicida*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *Mycobacterium marinum*, *P. anguilliseptica* e *T. maritimum*.

### 5.2.3 Detecção das subespécies de *P. damsela* em amostras ambientais

Para a detecção das duas subespécies de *P. damsela* em amostras ambientais, utilizou-se a metodologia de *nested* PCR, anteriormente descrita. Deste modo, as amostras com um resultado positivo de amplificação no 1ºPCR foram novamente amplificadas num 2ºPCR, à Ta de 61°C (programa de amplificação exibido na Tabela 8 com Ta1 e Ta2 de 61°C).



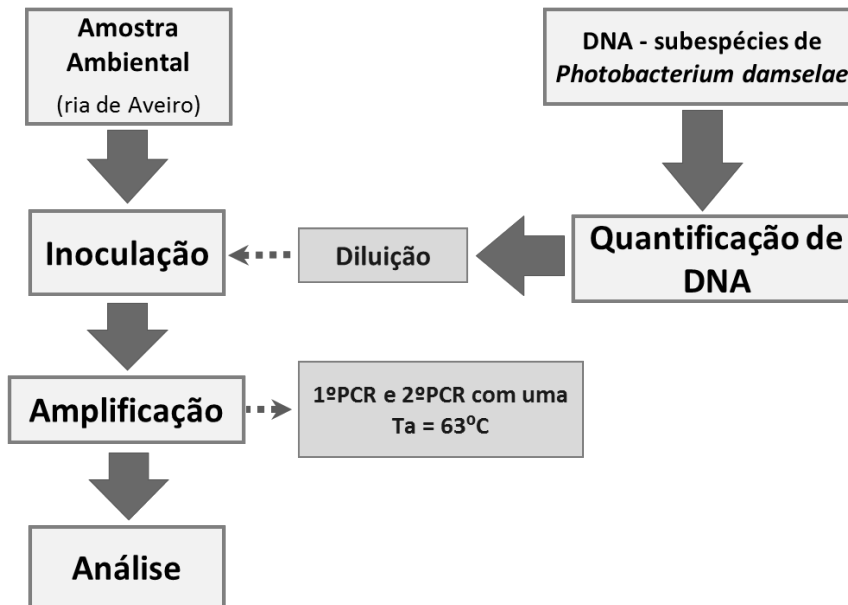
Os resultados obtidos foram analisados através das técnicas de eletroforese em gel de agarose e DGGE. Dado que a análise do gel de DGGE revelou a presença de bandas de amplificação inespecífica, revelou-se ser necessária a otimização da reação. Nesta otimização, testou-se a utilização de acetamida em vez de BSA no 1ºPCR (Tabela 11). Esta metodologia visa promover um aumento da especificidade dos *primers*, sendo, para tal, necessária a subida da Ta. Assim é necessário testar novamente a amplificação a diferentes temperaturas. Neste sentido, foi testada a amplificação com Ta1 de 58°C a 63°C e Ta2 de 62°C a 63°C, que possibilitou a seleção de uma Ta de 63°C (a utilizar em ambos os PCRs), temperatura à qual as amostras ambientais foram novamente amplificadas.

**Tabela 11** - Reagentes e respetivos volumes e concentrações utilizados no 1ºPCR e 2ºPCR para a otimização da deteção de *P. damsela* subsp. *piscicida* e de *P. damsela* subsp. *damsela* em amostras ambientais.

Reagentes	Concentração	Volume (µL)	
		1ºPCR	2ºPCR
Água		9,0	8,5
DNA		1,0	1,0
Dream Taq PCR <i>Master Mix</i>	2×	12,5	12,5
Acetamida	500 mg/ml	2,0	2,0
Toxrn1-F	$10 \times 10^{-6}$ M	0,25	
Toxrn1-R	$10 \times 10^{-6}$ M	0,25	
Toxrn2-GC-F	$10 \times 10^{-6}$ M		0,5
Toxrn2-R	$10 \times 10^{-6}$ M		0,5
<b>Volume total por reação</b>		25,0	25,0

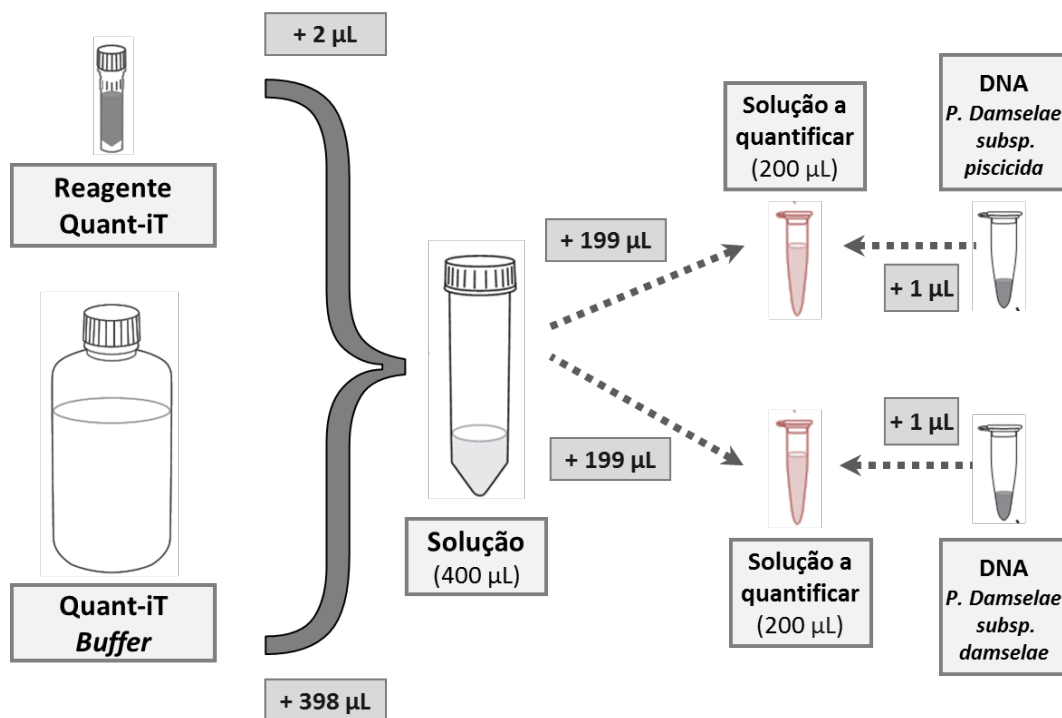
#### 5.2.4 Inoculação de uma amostra da ria de Aveiro com de DNA de *P. damsela*

A deteção das subespécies de *P. damsela* em amostras ambientais, apenas revelou a presença da espécie *P. damsela* subsp. *piscicida*. Assim, de modo a testar a eficiência da metodologia desenvolvida na deteção da subespécie de *P. damsela* subsp. *damsela*, procedeu-se à inoculação de uma amostra ambiental com DNA puro de cada uma das subespécies, promovendo-se a sua amplificação e posterior análise (Figura 19).



**Figura 19** – Representação esquemática do protocolo utilizado: quantificação de DNA, inoculação de uma amostra ambiental, amplificação e análise.

Para a quantificação do DNA de cada uma das subespécies foi utilizado um kit de quantificação (Quant-iT assays, Invitrogen), utilizando-se o seguinte protocolo experimental (Figura 20):

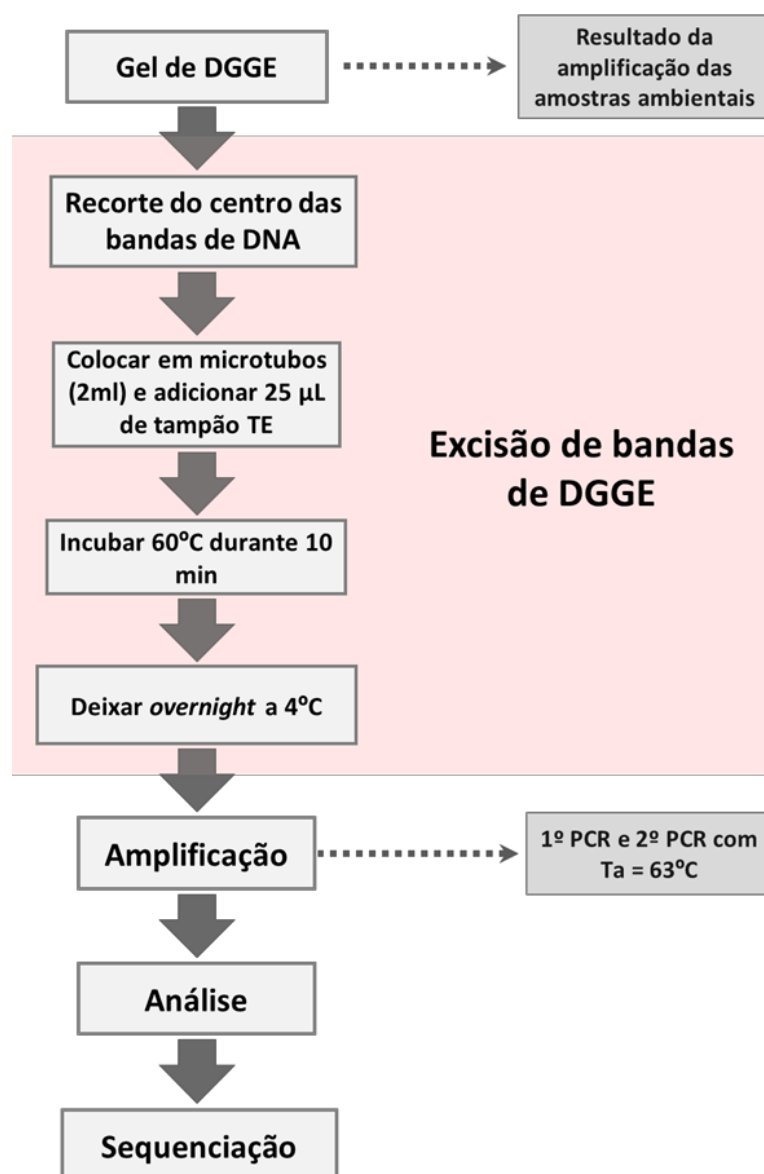


**Figura 20** – Representação esquemática do protocolo utilizado para a quantificação do DNA das duas subespécies em estudo (adaptado do protocolo fornecido com o kit - Quant-iT assays, Invitrogen).

A diluição do DNA das duas subespécies foi feita de forma a igualar as suas concentrações, para posteriormente serem adicionadas à amostra ambiental da ria de Aveiro (inoculação). Para a inoculação, foi adicionado um volume de 0,75  $\mu\text{L}$  de DNA diluído (de cada uma das subespécies) a 3,5  $\mu\text{L}$  de amostra. Após a inoculação, as amostras foram amplificadas (com Ta1 e Ta2 de 63°C) e a análise dos produtos foi feita através das técnicas de eletroforese em gel (20 min a 100 V) e de DGGE (16 h a 60°C e 70 V).

### 5.2.5 Excisão de bandas de DGGE, amplificação e sequenciação

Durante a análise dos resultados obtidos na amplificação de amostras ambientais (ponto 5.2.3), detetou-se a presença de bandas desconhecidas. Para a sua análise foi feita a excisão das bandas do gel de DGGE para posterior sequenciação (Figura 21).



**Figura 21** - Representação esquemática do protocolo utilizado na excisão de bandas do gel de DGGE: excisão de bandas de DGGE, amplificação e sequenciação.

Após a excisão das bandas, as amostras obtidas foram amplificadas (*nested* PCR) utilizando uma Ta de 63°C e a visualização dos produtos foi feita através da utilização das técnicas de eletroforese em gel de agarose (20 min a 100 V) e de DGGE (16 h a 60°C e 70 V). Por fim, as amostras foram sequenciadas (sequenciação de Sanger, GATC Biotech, Konstanz, Alemanha).

## 5.3 Visualização e análise dos produtos amplificados

### 5.3.1 Eletroforese em gel de agarose

A visualização e análise de todos os produtos amplificados, tanto da reação LAMP como da reação de PCR, foram realizadas através da técnica de eletroforese em gel de agarose, com uma fonte de alimentação, modelo EPS 300 IIV, CBS da Scientific e um transiluminador de UV, modelo ChemiDoc XRS+ System Image Lab da BIO-RAD, utilizando GelRED como corante de ácidos nucleicos.

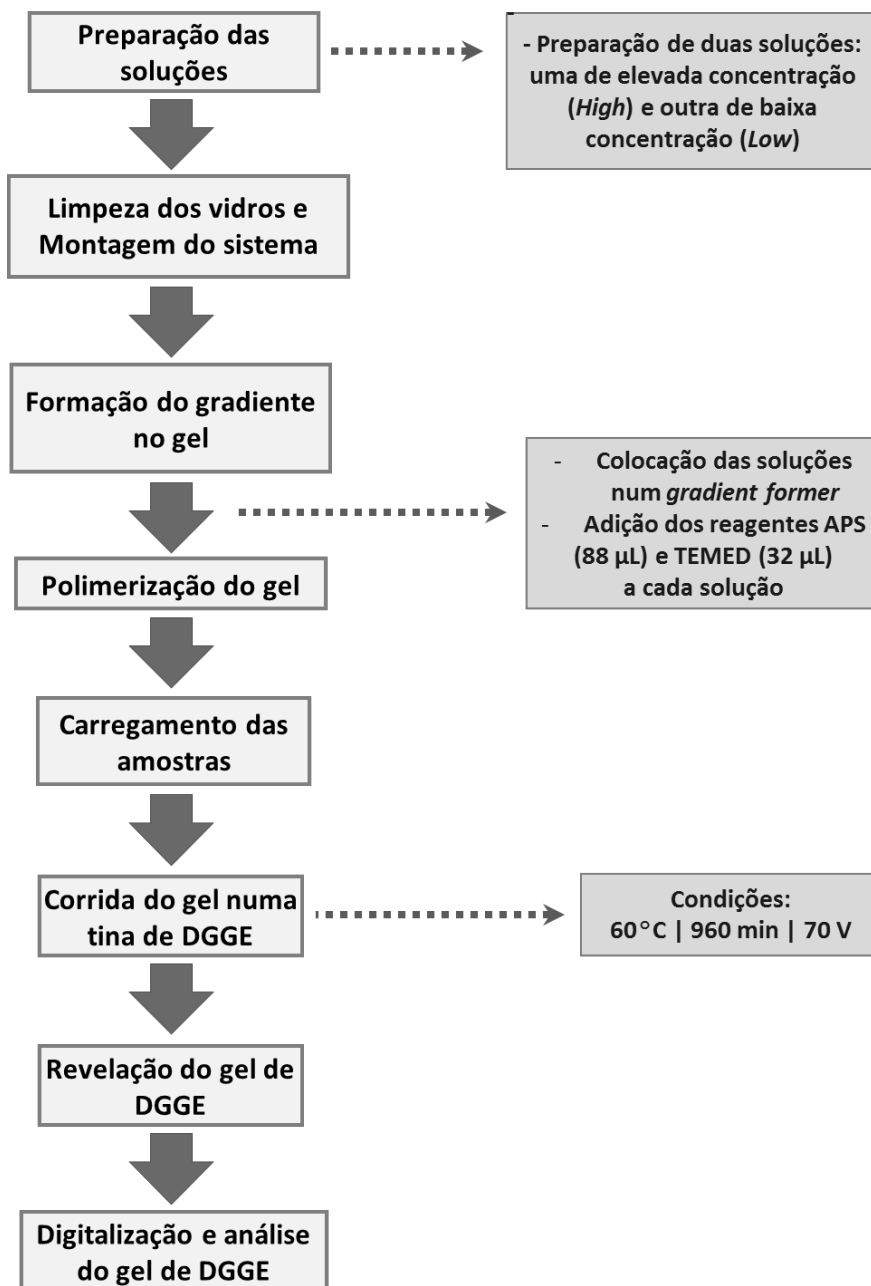
Para a análise dos produtos da reação LAMP foram utilizados géis de agarose a 2%, com uma corrida de amostras de 30 min a 100 V. No caso do PCR, esta análise foi feita utilizando géis de agarose a 1%, com uma corrida de amostras de 20 min a 100 V.

### 5.3.2 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE possibilita a separação de fragmentos de DNA de acordo com as suas sequências de pares de bases, permitindo assim a separação de diferentes fragmentos de DNA de comprimento idêntico mas com diferentes sequências nucleotídicas [86].

A separação dos diferentes fragmentos de DNA, ocorre devido à sua migração ao longo de uma matriz de acrilamida contendo um gradiente crescente de agentes desnaturantes de DNA (formamida e ureia). Ao longo da sua migração, ocorre a desnaturação parcial das suas cadeias duplas de DNA levando a uma diminuição da mobilidade eletroforética. Uma vez terminada a migração dos diferentes fragmentos (amostras), o gel obtido irá exibir um padrão de bandas, onde cada banda irá representar uma subespécie, espécie ou mesmo grupos de espécies de bactéria [85, 86]. No presente trabalho, a técnica de DGGE foi utilizada na análise dos produtos de PCR, a qual permitiu a comparação de bandas e a distinção das duas subespécies de *P. damsela*. A análise das amostras no gel foi feita através da comparação das bandas presentes nas amostras estudadas com as bandas exibidas por *P. damsela* subsp. *piscicida* (marcador de *P. damsela* subsp. *piscicida*) e *P. damsela* subsp. *damsela* (marcador de *P. damsela* subsp. *damsela*), o que permitiu a distinção das duas subespécies estudadas. De modo a facilitar a análise dos géis, para além da utilização de marcadores de cada uma das subespécies, foi também criado um marcador composto pela combinação do DNA de ambas as subespécies em estudo (*P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp. *damsela*).

Durante o desenvolvimento deste trabalho experimental, a preparação dos géis de DGGE foi feita de acordo com o seguinte protocolo (Figura 22):



**Figura 22** - Representação esquemática do protocolo geral utilizado para realização de um DGGE.

A preparação inicial das soluções foi feita utilizando um gradiente de 57% para a solução *High* e 37% para a solução *Low* (Tabela 12). A preparação do gradiente e polimerização do gel foram levadas a cabo num *gradient former*, onde a cada uma das soluções (*high* e *low*), previamente preparadas, foram adicionados os agentes polimerizantes APS (*Ammonium Persulfate Solution*) e TEMED (*N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine*).

**Tabela 12** - Reagentes e volumes utilizados na preparação das soluções a serem utilizadas no procedimento de DGGE (solução *High* e *Low*).

Reagentes	Soluções	
	<i>Low</i> (37%)	<i>High</i> (57%)
Ureia	2,17 g	3,83 g
TAE (50x)	0,32 ml	0,32 ml
Formamida	2,07 ml	3,65 ml
Acrilamida	3,11 ml	5,32 ml
Água miliQ	Perfazer até 16 ml	
APS	88 µL	
TEMED	32 µL	

Após carregar as amostras no gel, a corrida foi feita a 60°C durante 16 h a 70 V numa tina de DGGE, com uma fonte de alimentação (EPS 300 IIV, CBS Scientific). Após a corrida, a revelação do gel foi feita recorrendo a três soluções: de coloração, de desenvolvimento e STOP (Tabela 13).

**Tabela 13** – Soluções e reagentes necessários para a revelação de um gel de DGGE.

Soluções	Reagente	Quantidade
Solução de coloração	Etanol (96%)	15 ml
	Ácido Acético	0,75 ml
	Nitrato de Prata	0,3 g
Solução de desenvolvimento	Hidróxido de sódio (9%)	50 ml
	Formaldeído	0,405 ml
Solução STOP	Hidrogenocarbonato de Sódio	7,5 g
	Água destilada	1,0 L

A coloração e fixação do gel obtido são feitas através da adição da solução de coloração, deixando-se atuar durante cerca de 18 min. Após uma lavagem com água miliQ, segue-se a adição da solução de desenvolvimento. Esta irá promover a revelação do gel, onde poderá ser observado o aparecimento das bandas através do seu escurecimento; o gel toma uma coloração amarela. A atuação desta solução decorre durante 5 a 10 min (consoante a intensidade das bandas pretendida) em banho-maria a 55°C. Por fim, adiciona-se a solução STOP, que termina o processo de revelação do gel, procedendo-se à digitalização do mesmo (Epson perfection V700, *Photo Scanner*). O procedimento experimental utilizado para a revelação do gel de DGGE foi adaptado do estudo de Byun *et al.*[87].

## 6. Resultados e Discussão

O presente estudo oferece um conjunto integrado de métodos para identificação da espécie *P. damsela* e distinção das suas subespécies *P. damsela* subsp. *damsela* e *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Numa primeira fase, testou-se a detecção e distinção das duas subespécies utilizando a técnica LAMP, no entanto tal não foi possível. Numa segunda fase, promoveu-se a detecção e distinção das duas subespécies em amostras ambientais de aquacultura, utilizando as técnicas de PCR e DGGE.

### 6.1 LAMP

O objetivo principal, desta parte do presente trabalho, consiste na detecção de sequências do gene *Toxr* de cada uma das duas subespécies de *P. damsela*, através da técnica LAMP. Para tal, foram desenhados diferentes *primers* específicos, que promovessem a amplificação das zonas de maior variabilidade entre as duas subespécies (zonas com as maiores diferenças de nucleótidos). Os diferentes ensaios foram realizados de acordo com as informações disponibilizadas por diferentes autores, de acordo com a bibliografia encontrada [37, 38, 59, 61, 62, 65].

Os primeiros ensaios realizados (descritos no ponto 5.1.2) visaram testar a amplificação sob condições padrão, nomeadamente uma amplificação a 63°C durante 60 min. Estas condições foram utilizadas em diferentes estudos, por diferentes autores, tendo sido consideradas as mais adequadas a utilizar numa reação LAMP [37, 60, 61]. No entanto, apesar de todos os testes realizados, não foi possível obter resultados de amplificação positivos.

Numa tentativa de otimizar as condições de reação para obter o êxito da reação, foram realizados diferentes ensaios testando a utilização de DNA desnaturado e não desnaturado, bem como diferentes temperaturas e tempos reacionais. As diferentes condições testadas foram selecionadas de acordo com os diferentes estudos publicados por diferentes autores [36, 38, 59, 61, 62, 65]. No entanto, também não se conseguiram resultados de amplificação positivos.

Seguidamente, a tentativa de detecção de *V. parahaemolyticus* foi executada de modo a funcionar como reação controlo. Contudo, esta também não resultou, apesar de ser levada a cabo de acordo com o protocolo experimental descrito por Chen *et al.* [77] (descrito no ponto 5.1.3), pelo que seriam esperados resultados de amplificação positivos. Uma vez que não foi conseguida a detecção de *P. damsela*, nem de *V. parahaemolyticus*, fica assim por determinar se os *primers* desenhados no presente trabalho são funcionais. As razões responsáveis pelo insucesso de ambas as reações são desconhecidas.

Uma pesquisa informal (contacto com profissionais da área e consulta de *blogs* científicos) revelou que a técnica LAMP apresenta problemas de padronização, existindo dificuldade na replicação dos resultados exibidos em muitos estudos publicados, como o caso do estudo de Chen *et al.* [77] para a detecção de *V. parahaemolyticus*.

Apesar de todas as vantagens da técnica LAMP (reportadas em diferentes estudos [36-38, 59, 65], as quais incluem amplificação específica e eficiente e elevada sensibilidade e rapidez, no presente estudo não foi possível verificar nenhuma das mesmas. No que toca às desvantagens apresentadas por esta técnica, verificou-se que, tal como descrito anteriormente, esta exige um desenho de *primers* complexo [32, 37] e possui potenciais problemas de padronização.

Embora de futuro se pretenda dar continuidade a este estudo, depois dos resultados obtidos, optou-se por uma mudança de abordagem. Assim, mantendo o objetivo de detecção e distinção das subespécies de *P. damsela*, recorreu-se à utilização de técnicas moleculares convencionais, nomeadamente amplificação com PCR e análise dos seus produtos com DGGE.

## 6.2 PCR

A detecção e distinção das subespécies *P. damsela* subsp. *damsela* e *P. damsela* subsp. *piscicida* foi realizada através das técnicas de PCR e DGGE. Tal como já foi referido, a utilização da técnica de PCR para amplificação de DNA bacteriano apresenta um enorme potencial. Esta tem sido vastamente utilizada na detecção de agentes patogénicos bacterianos de grande relevância e impacto para a aquacultura [49, 50, 52-58, 88-90]. Durante a realização deste trabalho, a técnica de PCR demonstrou não só ser adequada para a detecção de *P. damsela*, como também exibiu elevada sensibilidade e eficiência. Isto encontra-se de acordo com as vantagens enumeradas em diferentes estudos para esta técnica [37, 79].

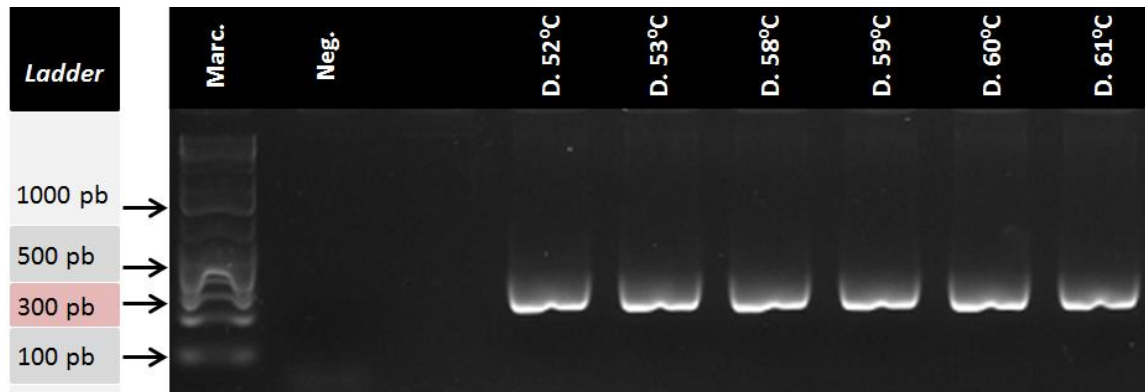
No presente estudo, a técnica de DGGE, permitiu não só a análise dos produtos obtidos durante a amplificação, mas também a distinção das duas subespécies em estudo.

Inicialmente, foram analisados os resultados referentes ao teste dos *primers* e otimização da temperatura de emparelhamento. Posteriormente, foi feita a detecção das duas subespécies de *P. damsela* em amostras ambientais de aquacultura.

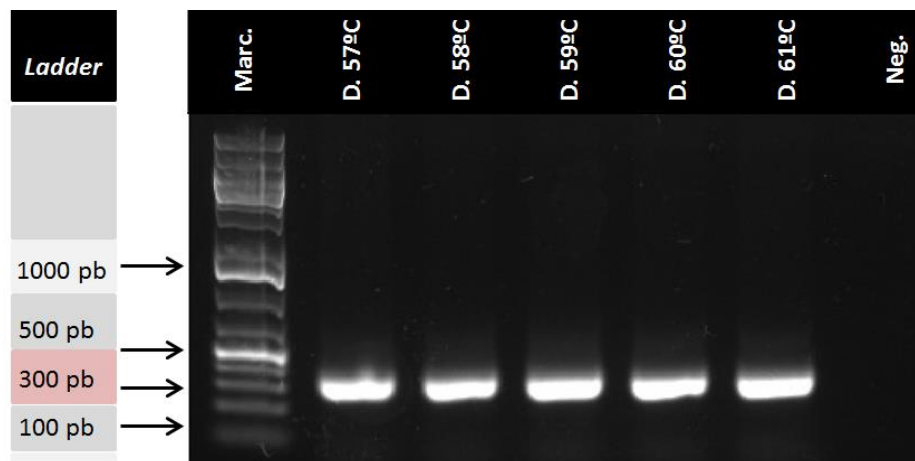
### 6.2.1 Teste dos *primers* e otimização da temperatura de emparelhamento

A validação experimental de *primers* é feita utilizando DNA puro (extraído geralmente de culturas puras) das espécies (ou subespécies) estudadas [19, 27, 40, 49, 52]. Assim, de modo a testar os dois conjuntos de *primers*, procedeu-se à amplificação de DNA puro de *P. damsela* subsp. *damsela*, a diferentes temperaturas: 52°C, 53°C, 58°C, 59°C, 60°C e 61°C. Os produtos obtidos foram analisados através de géis de eletroforese (Figura 23 e Figura 24).





**Figura 23** – Gel de agarose a 1% referente ao teste e otimização da Ta dos *primers*; Produtos do 1ºPCR: Marc.– Marcador, Neg. – Controle negativo, D.52°C, D.53°C, D.58°C, D.59°C, D.60°C, D.61°C – Produtos da amplificação de DNA puro de *P. damsela* subsp. *damsela* a diferentes temperaturas.



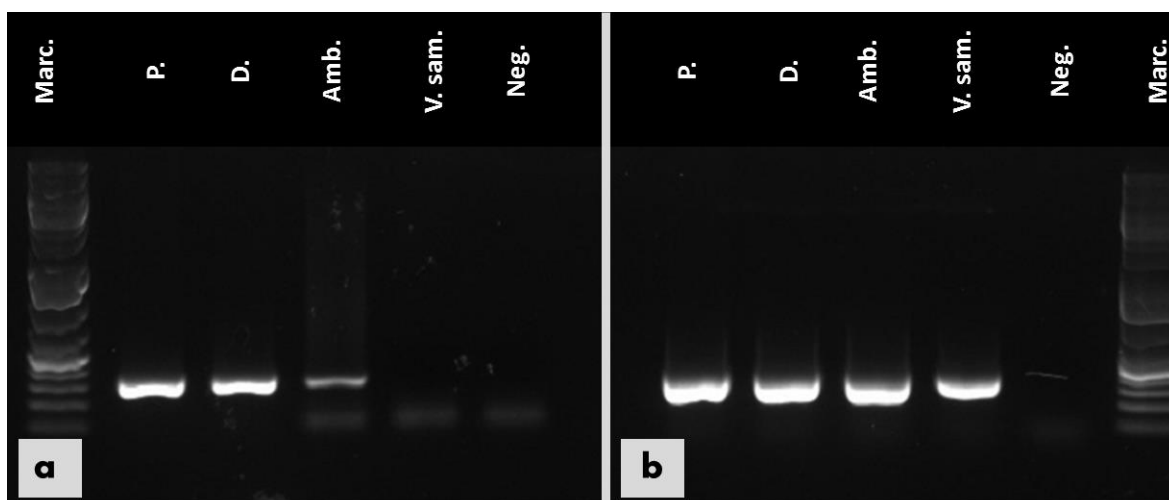
**Figura 24** – Gel de agarose a 1% referente ao teste e otimização da Ta dos *primers*; Produtos do 2ºPCR: M – Marcador, Neg. – Controle negativo, D.57°C, D.58°C, D.59°C, D.60°C, D.61°C – Produtos resultantes da amplificação de DNA puro de *P. damsela* subsp. *damsela* a diferentes temperaturas.

Através da análise dos produtos resultantes do 1ºPCR e 2ºPCR (Figura 23 e Figura 24, respetivamente) é possível observar que foram obtidos resultados de amplificação positiva para todas as Ta testadas, nomeadamente: 52-53°C e 58-61°C para o 1ºPCR e 57- 61°C para o 2ºPCR. O marcador de 1000 pb utilizado, indica a obtenção de fragmentos (produtos) com 300 (Figura 23 – marcador Marc. e amostras D.52°C, D.53°C, D.58°C, D.59°C, D.60°C, D.61°C) e 323 pb (Figura 24 – marcador Marc. e amostras D.57°C, D.58°C, D.59°C, D.60°C, D.61°C), o que se encontra de acordo com o esperado. Estes resultados indicam que os pares de *primers* utilizados, Toxrn1-F e Toxrn1-R, Toxrn2-GC-F e Toxrn2- R, são funcionais, reconhecendo e amplificando fragmentos de DNA puro das subespécies de *P. damsela* (neste caso *P. damsela* subsp. *damsela*), de acordo com o esperado.

Com este procedimento, pretendeu-se não só testar o funcionamento dos *primers*, mas também a amplificação a diferentes temperaturas. A gama de temperatura utilizada (52°C, 53°C, 58°C, 59°C, 60°C e 61°C) foi escolhida em função das temperaturas de desnaturação dos *primers* [42]. Assim, uma vez que o primeiro conjunto de *primers* apresenta uma Tm entre 58,3°C e 61,1°C

e o segundo conjunto de *primers* uma  $T_m$  entre 59,5°C e 60,1°C, a gama de  $T_a$  a testar variou entre os 52°C e os 61°C. Através da análise dos resultados obtidos (Figura 23 e Figura 24) verifica-se a obtenção de produtos em toda a gama de temperaturas testadas. A análise dos géis obtidos permite inferir sobre a intensidade da amplificação, tendo-se por objetivo a escolha da  $T_a$  para a qual são exibidos os melhores resultados de amplificação (maior intensidade). Como é possível observar, foram obtidos resultados de amplificações intensos e semelhantes para as diferentes temperaturas testadas (Figura 23 e Figura 24). Sendo necessária a escolha de uma  $T_a$ , foi selecionada a temperatura de 61°C, para ambos os PCRs, uma vez que, quanto maior a temperatura de emparelhamento, maior a especificidade dos *primers*. De acordo com o reportado por diferentes autores, verifica-se que a subida da  $T_a$  aumenta a especificidade dos *primers*, diminuindo ou eliminando amplificações inespecíficas [17, 27, 49].

Depois de comprovado o funcionamento dos dois conjuntos de *primers* e de definida a  $T_a$  de 61°C, testou-se a amplificação das duas subespécies, obtendo-se os resultados exibidos na Figura 25.



**Figura 25** – Géis de agarose a 1% referentes à amplificação a uma  $T_a$  de 61°C; **a.** Produtos do 1ºPCR; **b.** Produtos do 2ºPCR. M – Marcador, Neg. – Controlo negativo, P. - *P. damselae* subsp. *piscicida*, D. - *P. damselae* subsp. *damselae*, Amb. – Amostra ambiental, V.sam. – *V. salmonicida*.

A análise dos resultados obtidos demonstra que a amplificação das duas subespécies em estudo foi conseguida (Figura 25 – amostras P. e D.), obtendo-se fragmentos com 300 pb (Figura 25.a) e 323 pb (Figura 25.b). Este resultado comprova que, tal como esperado, os *primers* utilizados reconhecem e amplificam fragmentos de DNA das subespécies *P. damselae* subsp. *damselae* e *P. damselae* subsp. *piscicida*. Conclui-se assim, que estes são capazes de amplificar as zonas de maior variabilidade das sequências do gene *Toxr*.

Durante este procedimento, testou-se também a potencialidade da metodologia desenvolvida na deteção de *P. damselae* em amostras ambientais. Desta forma, foi utilizada uma amostra ambiental de aquacultura, sabendo-se à partida que nela estaria presente a espécie *P. damselae*. Através dos resultados obtidos, é possível observar que os *primers* amplificaram com

sucesso fragmentos com cerca de 323 pb (Figura 25.b – amostra Amb.), o que indica que estes foram capazes de detetar a espécie *P. damsela* na amostra ambiental.

Para além disto, de modo a testar a especificidade de cada conjunto de *primers*, foi amplificado DNA de *V. salmonicida* (amostra V. sam.). Sendo desenhados especificamente para a deteção de *P. damsela*, os *primers* não devem amplificar outras espécies. Na Figura 25.a é possível observar que não foram obtidos resultados de amplificação positivos para a amostra V. sam. (*V. salmonicida*), contrariamente ao verificado na Figura 25.b. Estes resultados permitem concluir que o primeiro conjunto de *primers* é mais específico do que o segundo. Devido a este resultado, a deteção das duas subespécies de *P. damsela* foi feita utilizando uma metodologia que combina a utilização das duas reações de PCR sequencialmente (*nested* PCR). Assim, o 1ºPCR será utilizado na deteção da espécie *P. damsela*, onde apenas as amostras com amplificação positiva no 1ºPCR são submetidas a uma segunda amplificação (2ºPCR).

Uma vez que a deteção da espécie *P. damsela* será feita no 1ºPCR, a especificidade do primeiro conjunto de *primers* foi novamente avaliada. Para tal, amplificaram-se 8 estirpes bacterianas diferentes, conhecidas por causar diferentes doenças em peixes, sendo comumente encontradas em ambientes marinhos e em sistemas de aquacultura [49, 52, 55, 56, 58, 77, 88-90]. Com este teste, não foram obtidos resultados positivos de amplificação, para as diferentes bactérias gram-negativas testadas (Figura 26 - amostras A.sal., V.par., V.sal., V.vul., V.alg., P.ang. e T.mar.), nem para a bactéria gram-positiva *Mycobacterium marinum* (Figura 26 – amostra M.mar.). Estes resultados encontram-se de acordo com o esperado, uma vez que os *primers* utilizados não amplificam outras espécies, a não ser *P. damsela*. Os resultados obtidos, quando comparados com os resultados de Zappulli *et al.* [19], indicam que os *primers* desenvolvidos no presente estudo apresentam elevada especificidade. No seu estudo, os autores desenvolveram dois conjuntos de *primers* específicos para a deteção da espécie *P. damsela* (P.dam-5a\_F e P.dam-5a\_R e P.dam-1a\_F e P.dam-1a\_R) e testaram a sua especificidade amplificando DNA de 7 outras estirpes bacterianas. Tal como no presente trabalho, Zappulli *et al.*[19] não obteve resultados de amplificação positivos para nenhuma outra estirpe bacteriana, desenvolvendo *primers* muito específicos que permitiram a deteção da espécie *P. damsela* [19].



**Figura 26** – Gel de agarose a 1% referente ao teste da especificidade do 1º conjunto de *primers*; Produtos do 1ºPCR: M – Marcador, Neg. – Controlo negativo, P. - *P. damsela* subsp. *piscicida*, D. - *P. damsela* subsp. *damsela*, A. sal. – *A. salmonicida*, V. par. – *V. parahaemolyticus*, V. sal.- *V. salmonicida*, V. vul. – *V. vulnificus*, V. alg. – *V. anguillarum*, M. mar. – *M. marinum*, P. ang. – *P. anguilliseptica*; T. mar. – *T. maritimum*.

A análise dos resultados desta parte do trabalho revelou que os *primers* desenhados são capazes de promover a detecção das duas subespécies em estudo, obtendo-se com sucesso fragmentos com 300 pb e 323 pb. Estes resultados indicam que a amplificação com o primeiro par de *primers* é altamente específica para *P. damsela*.

No presente estudo, a detecção das duas subespécies de *P. damsela* em amostras ambientais, foi feita utilizando uma metodologia de *nested* PCR, uma metodologia muito eficiente, que permitiu a utilização de ambos os conjuntos de *primers* através da realização sequencial de duas reações de PCR (1<sup>o</sup>PCR e 2<sup>o</sup>PCR). A utilização desta metodologia e a sua eficiência já foram anteriormente reportadas por Osório *et al.* [27]. Assim, uma vez que o primeiro conjunto de *primers* exibe elevada especificidade, este irá fazer o “despiste” para a presença de *P. damsela*. Em casos de resultados positivos de amplificação, os produtos obtidos no 1<sup>o</sup> PCR são novamente amplificados no 2<sup>o</sup>PCR, caso contrário, assume-se que a espécie *P. damsela* não se encontra presente.

### 6.2.2 Detecção de *P. damsela* subsp. *piscicida* e de *P. damsela* subsp. *damsela* em amostras ambientais

Tal como referido anteriormente, nas últimas décadas, foram realizados diferentes estudos utilizando a técnica de PCR de forma a desenvolver uma metodologia rápida, sensível e eficiente para detecção e distinção de *P. damsela* subsp. *piscicida* e *P. damsela* subsp. *damsela* [17, 19, 27, 39, 40]. No entanto, a elevada homologia genética evidenciada por estas duas subespécies faz com que a sua distinção seja extremamente difícil de atingir. Os diferentes estudos reportados, exibem grandes desvantagens, uma vez que requerem muitas vezes a utilização de metodologias de cultivo, não permitem a distinção em simultâneo das duas subespécies ou não testam a detecção em amostras ambientais [17, 19, 27, 39, 40]. A utilização de um método que permita a detecção e distinção das duas subespécies de *P. damsela* diretamente em amostras de tecidos, água ou sedimentos (amostras ambientais) é de extrema importância, para que possa haver um melhor controlo e prevenção destas duas doenças nas aquaculturas [19]. Para além disto, a sua discriminação é necessária devido às diferenças biológicas que apresentam, principalmente no que toca às diferenças de patogenicidade, uma vez que se verifica que ambas têm tendência a estar presentes em ambientes e espécies de peixes semelhantes [19].

Na presente parte do trabalho foram utilizadas amostras ambientais naturalmente infetadas por *P. damsela*. A utilização deste tipo de amostras já foi reportada, podendo referir-se o estudo de Gonzalez *et al.* [49], que promoveu a detecção de *L. anguillarum* em amostras de tecidos e sangue de peixes naturalmente infetados [49]. Assim, após conseguida a detecção das duas subespécies em estudo e avaliada a especificidade dos *primers*, procedeu-se à detecção das mesmas em amostras ambientais (de água) - provenientes de sistemas de aquacultura. Após amplificação com PCR, a distinção das duas subespécies foi conseguida utilizando a técnica de DGGE. A utilização da técnica de DGGE para discriminação entre subespécies já foi reportada, destacando-se o estudo de Griffiths *et al.* [91], que utiliza as técnicas de PCR para amplificação e DGGE para análise de produtos. A metodologia desenvolvida pelos autores permite a distinção dos tipos I, II e III de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* [91].

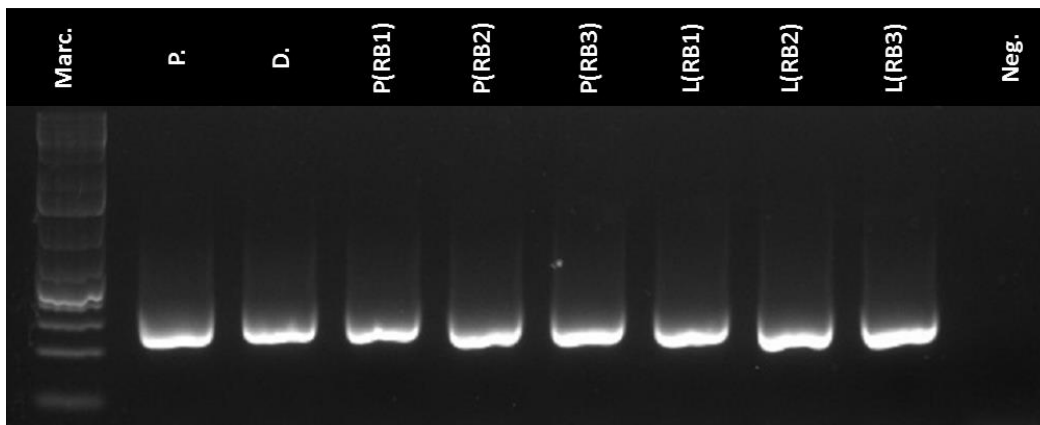
Primeiramente, foi necessária a seleção das amostras ambientais, seguindo-se a sua amplificação de acordo com a metodologia desenvolvida. A seleção das amostras foi feita com base num resultado de pirosequenciação (Tabela 14). Esta, identificou a presença de *P. damsela* nas amostras ambientais (método baseado na detecção do gene 16S RNA), não discriminando entre as duas subespécies em estudo.

**Tabela 14** – Resultado da pirosequenciação, onde é possível consultar a abundância relativa da espécie *P. damsela* nas amostras de água ambientais, recolhidas numa aquacultura com sistema de recirculação de água. Foram recolhidas amostras da fonte de alimentação de água (Sup), do tanque de produção (Pro), do tanque de sedimentação (Sed), do reator biológico (RB) e da câmara de Ozono (Ozo); de aquacultura de linguado (amostras: L(Pro), L(Sed), L(RB) e L(Ozo)) e de aquacultura de pregado (amostras: P(Pro), P(Sed), P(RB) e P(Ozo)).

Amostras	Abundância Relativa								
	Sup	L(Pro)	L(Sed)	L(RB)	L(Ozo)	P(Pro)	P(Sed)	P(RB)	P(Ozo)
<i>P. damsela</i>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,078	0,078	0,017	0,036

Segundo os dados da Tabela 14, foi detetada a presença da espécie *P. damsela* apenas nas amostras de aquacultura de pregado (Tabela 14 – amostras: P(Pro), P(Sed), P(RB) e P(Ozo)). Desta forma, foi selecionada a amostra com abundância relativa mais baixa (0,017%), a amostra P(RB), de modo a avaliar se a metodologia desenvolvida seria capaz de detetar baixas quantidades da espécie em estudo.

Selecionou-se também a amostra L(RB) (Tabela 14) de aquacultura de linguado, uma vez que, segundo a pirosequenciação, nesta amostra não se encontra presente a espécie *P. damsela*. Esta amostra foi selecionada de forma a testar se, com a metodologia desenvolvida se obtém o mesmo resultado. Para cada uma das amostras selecionadas foram utilizadas três réplicas, nomeadamente: P(RB1), P(RB2) e P(RB3) - réplicas da amostra P(RB); e L(RB1), L(RB2) e L(RB3) – réplicas da amostra L(RB). Numa segunda fase, foi então executada a detecção das duas subespécies de *P. damsela* nas 6 amostras ambientais (P(RB1), P(RB2), P(RB3), L(RB1), L(RB2) e L(RB3)).

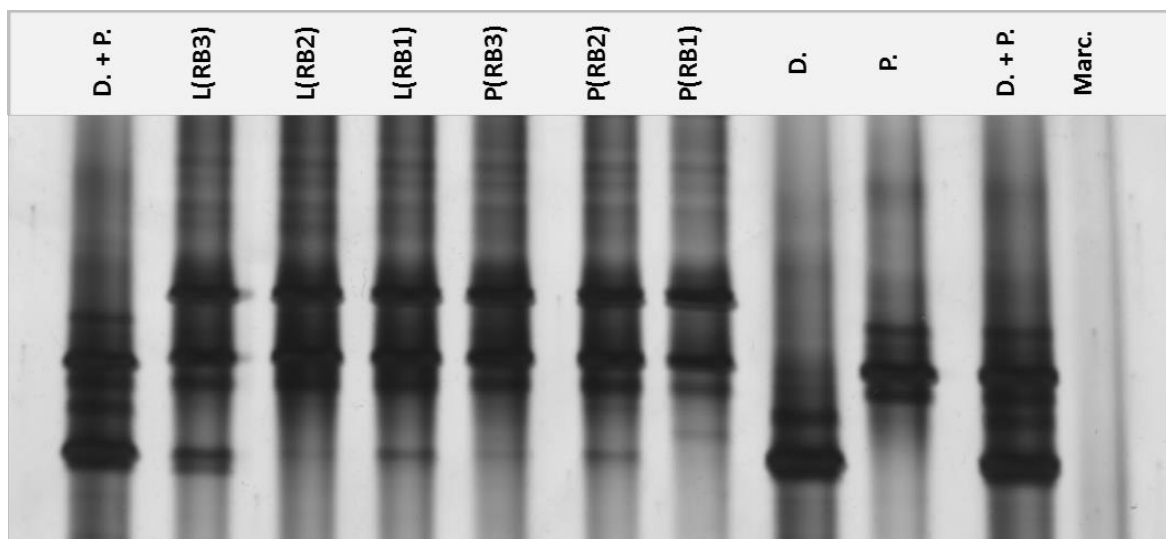


**Figura 27** - Gel de agarose a 1% referente à deteção de *P. damsela* subsp. *piscicida* e de *P. damsela* subsp. *damsela* em amostras ambientais; Produtos do 2<sup>o</sup>PCR: M – Marcador, Neg. – Controlo negativo, P. - *P. damsela* subsp. *piscicida*, D. - *P. damsela* subsp. *damsela*, P(RB1), P(RB2), P(RB3), L(RB1), L(RB2), L(RB3) – amostras ambientais amplificadas.

O resultado obtido (Figura 27) revela que foram obtidos resultados positivos de amplificação para todas as amostras ambientais utilizadas (Figura 27 – amostras P(RB1), P(RB2), P(RB3), L(RB1), L(RB2), e L(RB3)) bem como para cada uma das subespécies de *P. damsela*, que durante este ensaio funcionaram como controlo positivo da reação. Este resultado comprova que os *primers* foram capazes de detetar a presença da espécie *P. damsela* em amostras ambientais de aquacultura. No entanto, estes resultados não se encontram concordantes com o resultado da pirosequenciação, onde a espécie *P. damsela* apenas foi detetada nas amostras de aquacultura de pregado (Figura 27 - amostras P(RB1), P(RB2) e P(RB3)). A presente metodologia desenvolvida, detetou também a presença desta espécie nas amostras de aquacultura de linguado (Figura 27 - amostras L(RB1), L(RB2) e L(RB3)). Este resultado, não se encontra de acordo com o resultado da pirosequenciação, uma vez que esta técnica não detetou a presença da espécie *P. damsela* nestas amostras.

A pirosequenciação é uma técnica de sequenciação de DNA, que permite a caracterização detalhada dos ácidos nucleicos, comumente utilizada no estudo de sistemas biológicos (por ex., na caracterização de comunidades microbianas [80]). É uma técnica descrita como tendo elevada precisão e sensibilidade e uma vasta gama de aplicações [92]. No presente estudo, a pirosequenciação foi feita com recurso à análise de sequências do gene 16S rRNA, uma vez que a análise destas sequências, permite a caracterização (identificação) de um grande número de espécies bacterianas, a discriminação entre estirpes bacterianas e a deteção de mutações genéticas responsáveis pela resistência a agentes antimicrobianos [92, 93]. A sequenciação e análise de sequências do gene 16S rRNA, consiste numa importante ferramenta para a determinação das relações filogenéticas entre bactérias. No entanto, verifica-se que esta não permite a deteção das duas subespécies de *P. damsela*, tal como verificado nos estudos de Osório *et al.* [27, 39, 94]. Assim, no presente estudo, o facto de a pirosequenciação se ter baseado na deteção do gene 16S RNA faz com que, neste caso, esta se apresente como um método menos sensível e específico para a deteção da espécie *P. damsela*, podendo ocorrer a obtenção de “falsos negativos”, como foi o caso das amostras L(RB1), L(RB2) e L(RB3) deste trabalho. Através

dos resultados obtidos, é assim possível verificar que o método desenvolvido no presente trabalho (baseado na amplificação de sequências do gene *Toxr*), apresenta-se como um método extremamente específico e com elevada sensibilidade para a detecção da espécie *P. damsela*.

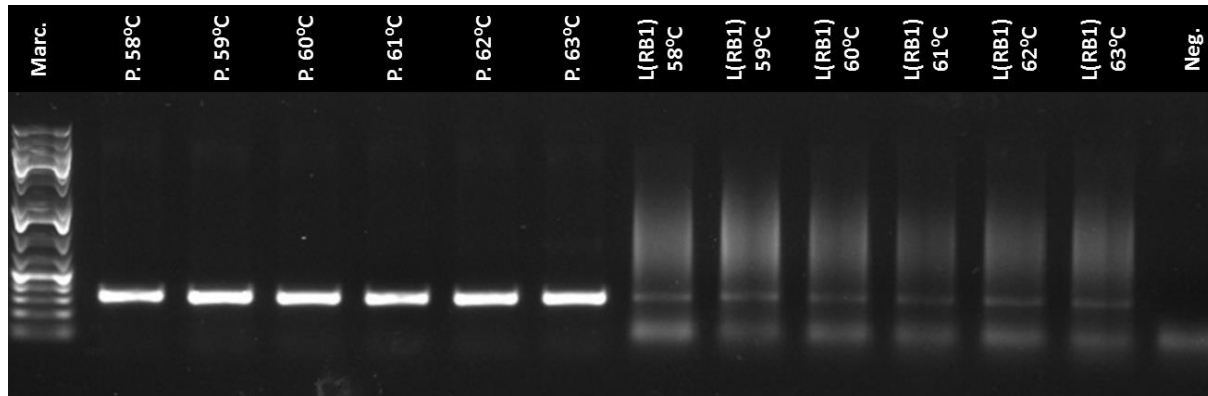


**Figura 28** – Gel de DGGE referente à detecção de *P. damsela* subsp. *piscicida* e de *P. damsela* subsp. *damsela* em amostras ambientais: M – Marcador, D + P – Marcador com *P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp. *damsela*, P. – Marcador de *P. damsela* subsp. *piscicida*, D. – Marcador de *P. damsela* subsp. *damsela*, P(RB1), P(RB2), P(RB3), L(RB1), L(RB2), L(RB3) – amostras ambientais amplificadas.

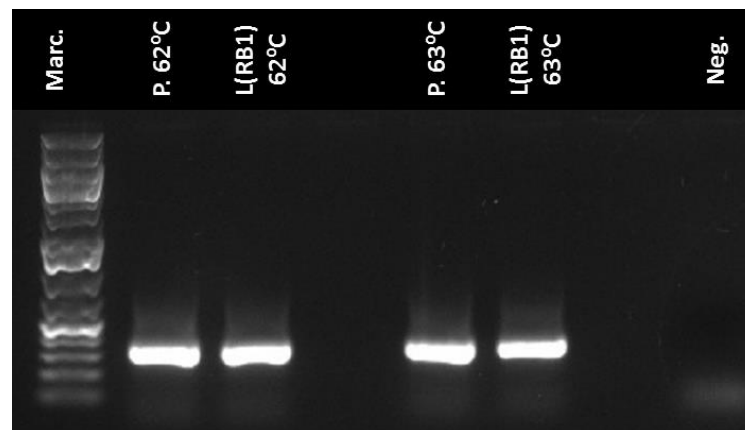
Tal como referido anteriormente, a técnica de DGGE permite a separação de fragmentos de DNA, tendo em conta as suas sequências de pares de bases [86]. Assim, uma vez que as sequências amplificadas (de tamanhos idênticos, nomeadamente 323 pb) do gene *Toxr* de cada uma das duas subespécies de *P. damsela* exibem diferenças de poucos nucleótidos [41], a técnica de DGGE possibilitou a discriminação entre elas, uma vez que os fragmentos correspondentes a cada uma das subespécies posicionam-se em diferentes zonas no gel.

Através da análise do gel de DGGE (Figura 28), é possível observar que todas as amostras ambientais exibem bandas predominantes de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Figura 28 – amostras L(RB1), L(RB2), L(RB3), P(RB1), P(RB2) e P(RB3)), uma vez que estas encontram-se alinhadas com o marcador de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Figura 28 – marcadores P. e D.+P.). No entanto, observa-se também a presença de diferentes bandas (de menor intensidade) tanto nos marcadores de *P. damsela* subsp. *piscicida* e *P. damsela* subsp. *damsela* (Figura 28 – marcadores D.+P., D. e P.), como nas amostras ambientais (Figura 28 – amostras L(RB1), L(RB2), L(RB3), P(RB1), P(RB2) e P(RB3)). É possível observar, que estas bandas de menor intensidade, se encontram localizadas tanto em cima como em baixo dos fragmentos correspondentes a *P. damsela* subsp. *piscicida* e *P. damsela* subsp. *damsela*. Presume-se que o aparecimento destas bandas se deva a ampliações inespecíficas dos *primers* utilizados. O aparecimento de bandas de amplificação inespecíficas é reportado por diferentes autores. Em muitos casos verifica-se que, a subida da  $T_a$  aumenta a especificidade dos *primers*, eliminando a produção destas bandas [17, 27,

49]. De modo a estudar um pouco esta questão e numa tentativa de suprimir o aparecimento destas bandas, procedeu-se novamente à otimização das reações de PCR. Para tal, foi testada a utilização de acetamida no 1ºPCR (em vez de BSA), o que exigiu o estudo de um novo gradiente de temperaturas. Com esta metodologia pretendeu-se promover um aumento da especificidade dos *primers*, sendo, para tal, necessária a subida da  $T_a$ .



**Figura 29** – Gel de agarose a 1% referente à otimização da reação; Produtos do 1ºPCR: M – Marcador, Neg. – Controlo negativo, P.58°C, P.59°C, P.60°C, P.61°C, P.62°C, P.63°C – Produtos resultantes da amplificação de DNA puro de *P. damsela* subsp. *piscicida* a diferentes temperaturas utilizando acetamida, L(RB1)58°C, L(RB1)59°C, L(RB1)60°C, L(RB1)61°C, L(RB1)62°C, L(RB1)63°C - Produtos resultantes da amplificação da amostra ambiental L(RB1) a diferentes temperaturas utilizando acetamida.



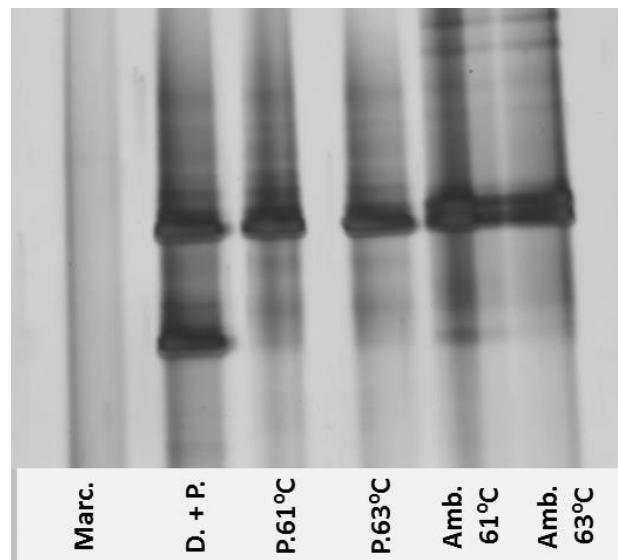
**Figura 30** - Gel de agarose a 1% referente à otimização da reação; Produtos do 2ºPCR: M – Marcador, Neg. – Controlo negativo, P.62°C, P.63°C – Produtos resultantes da amplificação de DNA puro de *P. damsela* subsp. *piscicida* a diferentes temperaturas utilizando acetamida, L(RB1)62°C, L(RB1)63°C - Produtos resultantes da amplificação da amostra ambiental L(RB1) a diferentes temperaturas utilizando acetamida.

A análise dos produtos obtidos durante a otimização do 1ºPCR e 2ºPCR demonstra que ocorreu amplificação em todas as  $T_a$  testadas, 58°C- 63°C para o 1ºPCR (Figura 29 – amostras para controlo positivo: P.58°C, P.59°C, P.60°C, P.61°C, P.62°C, P.63°C e amostras ambientais: L(RB1)58°C, L(RB1)59°C, L(RB1)60°C, L(RB1)61°C, L(RB1)62°C, L(RB1)63°C) e 62°C-63°C para o 2ºPCR (Figura 30 – amostras para controlo positivo: P.62°C, P.63°C e amostras ambientais:



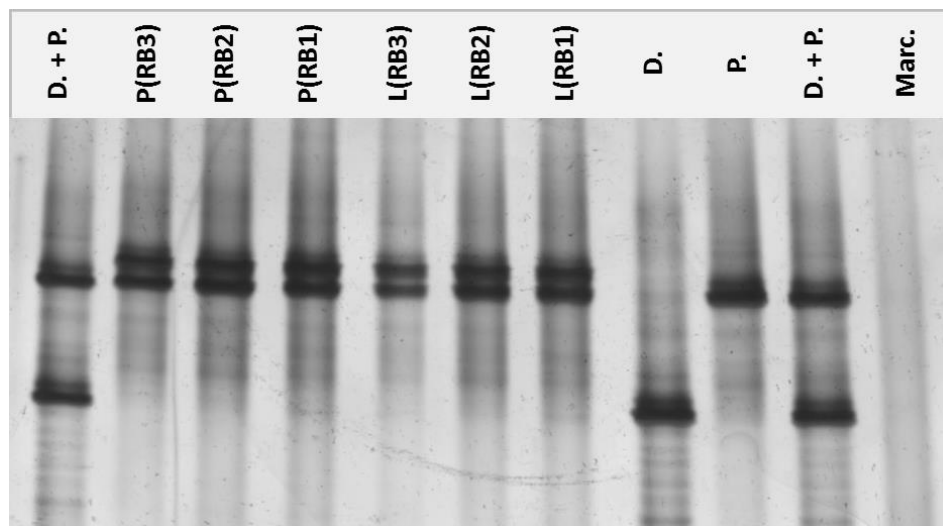
L(RB1)62°C, L(RB1)63°C). Tal como anteriormente, não se observam diferenças significativas nas intensidades das reações. Assim, de acordo com o reportado por diferentes autores, escolheu-se operar a uma Ta de 63°C, uma temperatura superior à anteriormente utilizada de 61°C, de modo a aumentar a especificidade dos *primers* e reduzir as amplificações inespecíficas [17, 27, 49].

Estes resultados foram também analisados num gel de DGGE (Figura 31), que permitiu a comparação das amostras amplificadas no 1ºPCR a 61°C utilizando BSA (amostras P.61°C e Amb.61°C) com as amostras amplificadas a 63°C com acetamida (amostras P.63°C e Amb.63°C).



**Figura 31** – Gel de DGGE referente à otimização da reação: M – Marcador, D + P – Marcador com *P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp. *damsela*, P.61°C, P.63°C – Produtos resultantes da amplificação de DNA puro de *P. damsela* subsp. *piscicida*, Amb.61°C, Amb.63°C - Produtos resultantes da amplificação da amostra ambiental L(RB1).

Esta análise permitiu verificar que foi conseguida a atenuação das bandas (de amplificação inespecífica) anteriormente detetadas (Figura 28). Assim, verificou-se que com a substituição de BSA por acetamida e com o aumento da Ta dos *primers* para 63°C, foi possível aumentar a sua especificidade e a da reação. Uma vez otimizadas as condições das reações, as amostras ambientais foram novamente amplificadas e o resultado obtido pode ser observado na Figura 32.



**Figura 32** – Gel de DGGE referente à amplificação de amostras ambientais a uma Ta de 63°C: M – Marcador, D + P – Marcador com *P. damselae* subsp. *piscicida* + *P. damselae* subsp. *damselae*; P. – Marcador de *P. damselae* subsp. *piscicida*, D. – Marcador de *P. damselae* subsp. *damselae*, P(RB1), P(RB2), P(RB3), L(RB1), L(RB2), L(RB3) – amostras ambientais amplificadas.

A análise do gel obtido (Figura 32) revela o desaparecimento da maioria das bandas de amplificação inespecífica tanto dos marcadores (Figura 32 – marcadores D.+P., D. e P.), como das amostras ambientais (Figura 32 – amostras P(RB3), P(RB2), P(RB1), L(RB3), L(RB2) e L(RB1)). Verificando-se o seu desaparecimento após a subida da Ta da reação para 63°C (Figura 32), o que se encontra de acordo com o que é reportado por diferentes autores [17, 27, 49]. Contudo, nas amostras ambientais (Figura 32 – amostras P(RB3), P(RB2), P(RB1), L(RB3), L(RB2) e L(RB1)) verifica-se ainda a presença de uma banda localizada acima dos fragmentos correspondentes a *P. damselae* subsp. *piscicida*, localizada acima do marcador de *P. damselae* subsp. *piscicida*. Uma vez que, após a otimização da reação, a presença destas bandas localizadas acima do marcador de *P. damselae* subsp. *piscicida* se mantém, foi necessária a sua análise. Deste modo, recorreu-se à excisão de bandas do gel de DGGE para amplificação e posterior sequenciação (ponto 6.2.4).

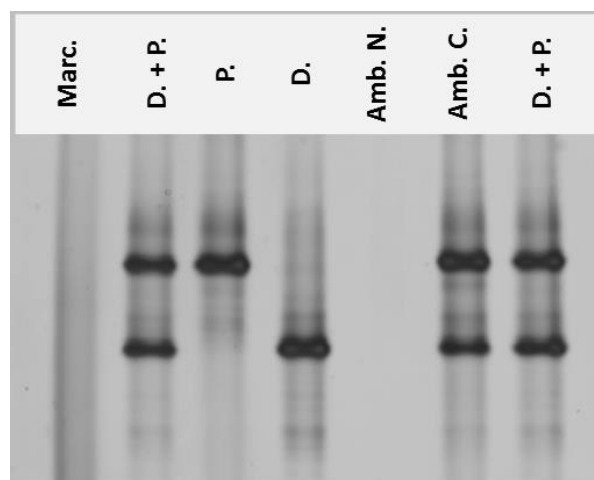
Para além disto, e tal como verificado anteriormente, nas amostras ambientais apenas foi detetada a presença da subespécie *P. damselae* subsp. *piscicida* (Figura 32). Com estes resultados, fica por provar a capacidade da metodologia desenvolvida na detecção das duas subespécies em simultâneo, em amostras ambientais. Por esta razão, foi utilizado um procedimento que envolve a preparação de uma amostra ambiental, onde se fez a sua inoculação com DNA de ambas as subespécies de *P. damselae* (ponto 6.2.3).

### 6.2.3 Inoculação de uma amostra ambiental para detecção das duas subespécies de *P. damselae*

O método desenvolvido anteriormente para detecção e distinção das duas subespécies de *P. damselae* em amostras ambientais, foi posteriormente utilizado na sua detecção numa amostra ambiental inoculada experimentalmente. Procedimentos semelhantes a este, já foram reportados

por diferentes autores, sendo na maioria dos casos utilizados de forma a validar as metodologias desenvolvidas [17, 19, 49, 52]. Embora nestes casos, a inoculação (infecção) seja feita experimentalmente, esta é muitas vezes feita diretamente em peixes, tecidos (guelras, rins, baço, fígado), sangue, entre outros, a partir dos quais é extraído o seu DNA [17, 19, 49, 52]. A inoculação é assim feita, de forma a aproximar as condições laboratoriais das condições presentes na natureza.

No presente estudo, este procedimento foi executado de modo a avaliar a eficiência da metodologia desenvolvida na detecção das duas subespécies, em simultâneo, uma vez que anteriormente não foi detetada a presença de *P. damsela* subsp. *damsela* nas amostras ambientais testadas. Assim, uma amostra da ria de Aveiro foi inoculada com DNA puro de ambas as subespécies e amplificada (utilizando uma Ta de 63°C) (Figura 33).



**Figura 33** – Gel de DGGE exibindo o resultado da inoculação de uma amostra ambiental da ria de Aveiro: M – Marcador, D + P – Marcador com *P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp. *damsela*, P. – Marcador de *P. damsela* subsp. *piscicida*, D. – Marcador de *P. damsela* subsp. *damsela*, Amb N. – Amostra ambiental da ria de Aveiro, Amb.C. - Amostra ambiental da ria de Aveiro inoculada com DNA de *P. damsela* subsp. *piscicida* e *P. damsela* subsp. *damsela*.

Através da análise dos produtos obtidos num gel de DGGE, é possível observar que a amostra inicial (Figura 33- Amb N.) não continha DNA de nenhuma das duas subespécies, mas que, após inoculação, foi possível a deteção de ambas (Figura 33 – Amb. C.). Observa-se a presença de duas bandas distintas, que se encontram perfeitamente alinhadas com os marcadores de *P. damsela* subsp. *damsela* (Figura 33 – marcador D. e D.+P.) e *P. damsela* subsp. *piscicida* (Figura 33 – marcador P. e D.+P.). Estes resultados demonstram que a metodologia desenvolvida promove a deteção e distinção (em simultâneo) das subespécies de *P. damsela*.

Os resultados obtidos, indicam que com este trabalho, desenvolveu-se uma metodologia eficiente de deteção e distinção das duas subespécies de *P. damsela*. No presente estudo, através da utilização das técnicas de PCR e DGGE, conseguiu-se a deteção e distinção destas duas subespécies em amostras ambientais (de água) de aquacultura. Tal como verificado no estudo de Griffiths et al. [91], a técnica de DGGE demonstrou ser adequada para a distinção de subespécies,

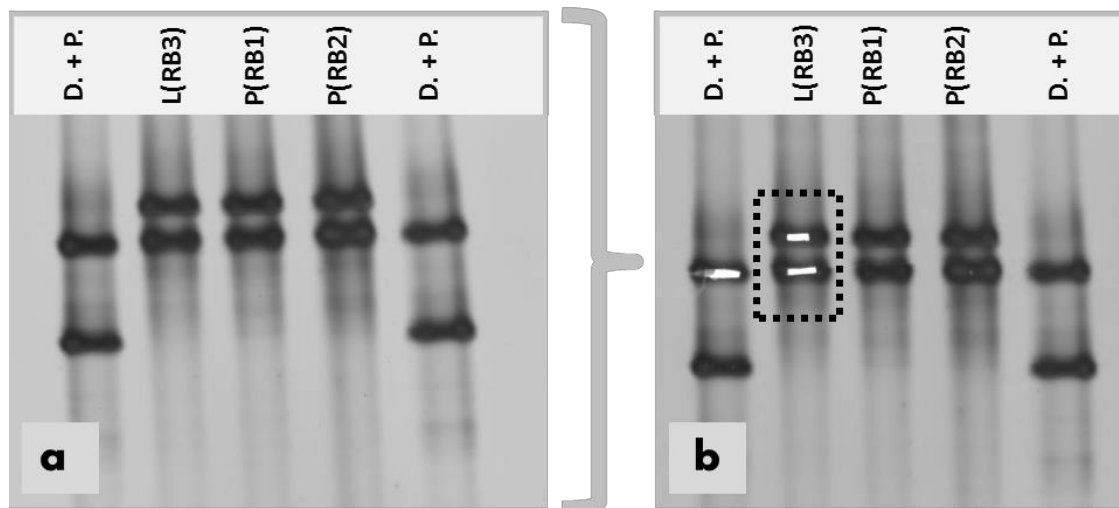
demonstrando ser capaz de detetar as sequências do gene *Toxr* amplificadas, permitindo a discriminação das duas subespécies de *P. damsela*.

O estudo desenvolvido no presente trabalho, quando comparado com estudos já existentes, demonstrou elevada eficiência e sensibilidade, sendo rápido e simples de executar. Uma das suas principais vantagens, em relação aos estudos anteriores, reside no facto de ter sido provada a sua viabilidade utilizando amostras ambientais de aquacultura. O método desenvolvido apresenta assim potencialidade de diagnosticar e ajudar a antecipar surtos de doenças nas aquaculturas, causados por *P. damsela* subsp. *piscicida* e *P. damsela* subsp. *damsela*.

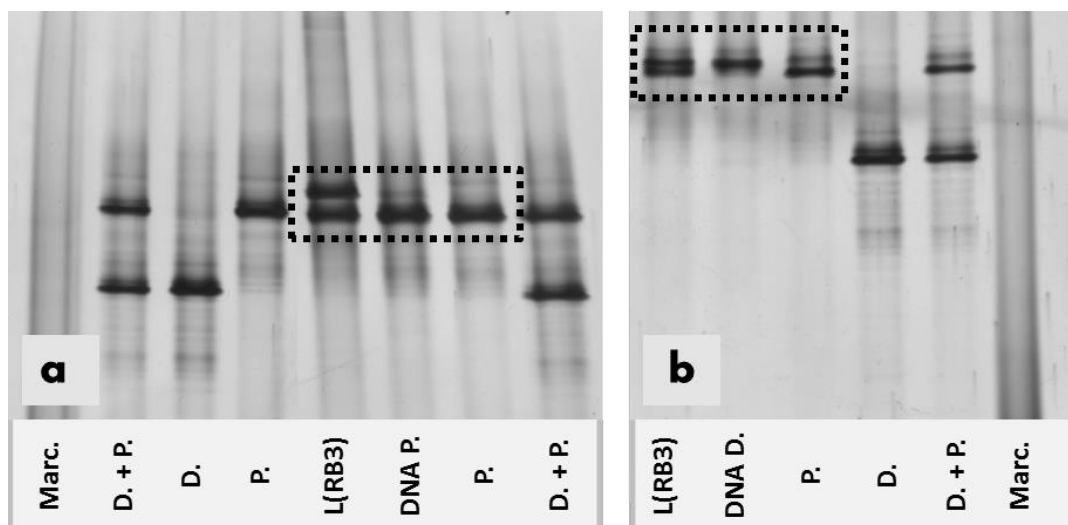
#### 6.2.4 Excisão de bandas de DGGE e análise da sequenciação de DNA

Tal como verificado anteriormente, a análise do gel de DGGE revelou a presença de bandas localizadas acima dos fragmentos correspondentes a *P. damsela* subsp. *piscicida*. Para a sua caracterização, foi utilizado um procedimento que envolveu a sua excisão do gel de DGGE, a sua amplificação e sequenciação. A possibilidade de excisão dos fragmentos obtidos do gel de DGGE consiste numa das grandes vantagens apresentadas por esta técnica, uma vez que possibilita uma análise rápida e eficiente dos produtos obtidos, permitindo a obtenção de DNA suficiente para sequenciação [95-98]. Deste modo, evita-se a clonagem dos produtos.

Na Figura 34.a é possível observar que as amostras ambientais, anteriormente amplificadas, exibem não só uma banda correspondente à espécie *P. damsela* subsp. *piscicida*, alinhada com o marcador de *P. damsela* subsp. *piscicida* (Figura 34.a – marcador D.+P.), mas também uma banda localizada acima deste marcador (Figura 34.a – amostras L(RB3), P(RB1) e P(RB2)). Para a sua análise foi feita a excisão das bandas da amostra L(RB3) (Figura 34.b – amostra L(RB3)), seguindo-se a sua amplificação. O resultado obtido após amplificação das amostras extraídas do gel pode ser observado na Figura 35.



**Figura 34** – a. Gel de DGGE referente à detecção de *P. damsela* subsp. *piscicida* e de *P. damsela* subsp. *damsela* em amostras ambientais (com Ta de 63°C): D + P – Marcador com *P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp. *damsela*, L(RB3), P(RB1), P(RB2) – amostras ambientais amplificadas; b. Excisão das bandas de DGGE da amostra L(RB3), onde se encontram destacadas a tracejado as bandas excisadas.



**Figura 35** – a. Gel de DGGE exibindo o resultado da excisão da banda de *P. damsela* subsp. *piscicida* da amostra ambiental L(RB3): DNA P. – DNA de *P. damsela* subsp. *piscicida* extraído da amostra ambiental L(RB3); b. Gel de DGGE exibindo o resultado da excisão da banda de DNA desconhecido da amostra ambiental L(RB3): DNA D. – DNA desconhecido extraído da amostra ambiental L(RB3); D + P – Marcador com *P. damsela* subsp. *piscicida* + *P. damsela* subsp. *damsela*, P. – Marcador de *P. damsela* subsp. *piscicida*, D. – Marcador de *P. damsela* subsp. *damsela*, L(RB3) – amostra ambiental L(RB3). Em ambas as figuras, as bandas correspondentes às amostras L(RB3), P., DNA P. (a) e DNA D. (b) encontram-se destacadas a tracejado para uma melhor visualização dos resultados obtidos.

Através da análise da Figura 35 é possível observar que, a partir da amostra L(BR3) (Figura 35.a – amostra L(RB3)) foi obtida uma amostra contendo apenas DNA de *P. damselae* subsp. *piscicida* (Figura 35.a – amostra DNA P.), uma vez que a banda exibida encontra-se alinhada com o marcador de *P. damselae* subsp. *piscicida* (Figura 35.a – marcador P. e D.+P.). A partir da banda localizada acima do marcador de *P. damselae* subsp. *piscicida* da amostra L(RB3) (Figura 34.b – amostra L(RB3)), foi obtida uma segunda amostra contendo apenas DNA “desconhecido” (Figura 35.b – amostra DNA D.). É possível verificar que, a banda exibida por esta amostra encontra-se alinhada com a banda da amostra L(RB3) (Figura 35.b – amostra L(RB3)), localizada acima do marcador *P. damselae* subsp. *piscicida* (Figura 35.b – marcador P. e D.+P.). Os resultados obtidos revelam que, após a excisão e amplificação das bandas da amostra L(RB3), foi conseguida a sua separação e uma vez atingido este resultado, ambas as amostras foram sequenciadas.

As sequências obtidas pela sequenciação de Sanger, foram analisadas através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponibilizada no site do NCBI [99]), o que permitiu a sua comparação com outras sequências parciais do gene *Toxr* de *P. damselae*. Esta comparação revelou que as amostras amplificadas (Figura 35.a - DNA P. e Figura 35.b – DNA D.) pertencem a diferentes linhagens da subespécie *P. damselae* subsp. *piscicida*. O resultado obtido revelou assim que, as bandas previamente observadas nas amostra ambientais, localizadas acima do marcador de *P. damselae* subsp. *piscicida*, correspondem a uma linhagem diferente de *P. damselae* subsp. *piscicida*. Com este resultado, é possível concluir que tanto os *primers* como a metodologia desenvolvida apresentam elevada especificidade, sendo capazes de detetar diferentes linhagens das subespécies em estudo, incluindo aquelas onde possam ter ocorrido mutações do gene *Toxr*.

## 7. Conclusões e Trabalho Futuro

As duas subespécies bacterianas gram-negativas, *P. damsela* subsp. *damsela* e *P. damsela* subsp. *piscicida*, são responsáveis por provocar grandes perdas em sistemas de aquacultura por todo o mundo, sendo de extrema importância a sua detecção (atempadamente). Por este facto, o presente trabalho propõe uma nova abordagem para a detecção das duas subespécies baseada na amplificação de sequências parciais do gene *ToxR*.

Inicialmente, pretendia-se conseguir a sua detecção utilizando a técnica de amplificação isotérmica LAMP. No entanto, apesar de se terem realizado diferentes ensaios, testando a amplificação a diferentes temperaturas e tempos reacionais, o sucesso da reação não foi conseguido. O insucesso obtido na detecção de *V. parahaemolyticus* (reação controlo), para a qual seriam esperados resultados positivos de amplificação, fez com que as razões por detrás deste insucesso continuassem desconhecidas. Desta forma, não foi possível avaliar o funcionamento dos *primers* desenvolvidos. Este facto conduziu a uma mudança de abordagem, através da qual a detecção das sequências parciais do gene *ToxR* das duas subespécies em estudo foi realizada e conseguida utilizando as técnicas de PCR e DGGE.

Na reação de PCR, os *primers* utilizados detetaram a espécie *P. damsela*, amplificando com sucesso fragmentos com 300 e 323 pb, comprovando-se deste modo que, estes não só apresentam características promissoras *in silico*, como também são funcionais. Estes exibiram também elevada sensibilidade, uma vez que não amplificaram nenhuma outra espécie bacteriana. Através da técnica de PCR, foi possível a amplificação de sequências do gene *ToxR*, o que permitiu uma detecção específica da espécie *P. damsela*. A técnica de DGGE permitiu a discriminação das duas subespécies em estudo, *P. damsela* subsp. *damsela* e *P. damsela* subsp. *piscicida*.

O método desenvolvido foi capaz de promover a detecção de *P. damsela* subsp. *piscicida* em amostras ambientais, apresentando maior sensibilidade que a técnica de pirosequenciação na detecção da espécie *P. damsela*. A inoculação de uma amostra ambiental permitiu comprovar a eficiência da metodologia desenvolvida na detecção de *P. damsela* subsp. *damsela*.

A sequenciação de amostras obtidas após a excisão das bandas do gel de DGGE, revelou que os *primers* utilizados apresentam elevada especificidade, sendo a metodologia desenvolvida capaz de detetar diferentes linhagens das subespécies em estudo.

Com este trabalho, foi desenvolvida uma metodologia que permite a detecção e distinção das duas subespécies de *P. damsela* em amostras ambientais, que apresenta elevada eficiência e sensibilidade. A metodologia desenvolvida apresenta grande potencial, deixando em aberto a possibilidade de vir a ser utilizada no diagnóstico e prevenção de doenças nas aquaculturas. O método desenvolvido apresenta-se assim como uma alternativa válida aos métodos até aqui utilizados no diagnóstico de doenças causadas pelas duas subespécies de *P. damsela*.

Futuramente, no que toca à detecção de *P. damsela* utilizando a técnica LAMP, pretende-se dar continuidade ao estudo desenvolvido, recorrendo à utilização de um kit de amplificação (Mast

Isoplex DNA Amplification Kit, MastGroup), bem como realizar a confirmação do funcionamento dos conjuntos de *primers* desenvolvidos e deteção das duas subespécies.

Em relação ao estudo desenvolvido para a deteção de *P. damsela* através da técnica de PCR e DGGE, futuramente pretende-se realizar testes de forma a calcular o limite de deteção, através da técnica de RT-PCR.



## 8. Bibliografia

- [1] Fisheries and Aquaculture Department, "The State of World Fisheries and Aquaculture 2012," FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome2012.
- [2] Vale do Lima, "Aquacultura - Como validar a sua ideia de negócio?," 2005.
- [3] M. A. Reis-Henriques, "Manual de Aquacultura," *Ostra, amêijoas, camarão, truta, salmão, tilápia, enguia, dourada, robalo, pregado*, pp. 11-15, 1998.
- [4] Direcção Geral das Pescas e Aquicultura, "Estatísticas de Pesca 2010," DGPA, Lisboa2010.
- [5] A. Sapkota, A. R. Sapkota, M. Kucharski, J. Burke, S. McKenzie, P. Walker, and R. Lawrence, "Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities," *Environment International*, vol. 34, pp. 1215-1226, 2008.
- [6] Fisheries and Aquaculture Department, "The State of World Fisheries and Aquaculture 2008," FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome2008.
- [7] Fisheries and Aquaculture Department, "DNA-based Molecular Diagnostic Techniques: Research Needs for Standardization and Validation of the Detection of Aquatic Animal Pathogens and Diseases," FAO, Food and agriculture Organization of the United Nations, Thailand1999.
- [8] M. Sardinha, "Aquaculture on a national context " p. 6, 2009.
- [9] Direcção-Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos,. Aquicultura e Salicultura [Online].Available:<http://www.dgrm.minagricultura.pt/xportal/xmain?xpid=dgrm&actualmenu=54207&selectedmenu=168184&xpgid=genericPage&conteudoDetalhe=168786> (Acedido a 15 de Outubro 2013).
- [10] A. G. Murray and E. J. Peeler, "A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture," *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 67, pp. 223-235, 2005.
- [11] T. V. R. Pillay and M. N. Kutty, "Aquaculture: Principles and Practices (2nd edition)," vol. 15, p. 624, 2005.
- [12] K. Grigorakis and G. Rigos, "Aquaculture effects on environmental and public welfare – The case of Mediterranean mariculture," *Chemosphere*, vol. 85, pp. 899-919, 2011.
- [13] F. P. Meyer, "Aquaculture disease and health management," *Journal of Animal Science*, vol. 69, pp. 4201-4208, 1991.
- [14] A. E. Toranzo, B. Magariños, and J. L. Romalde, "A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems," *Aquaculture*, vol. 246, pp. 37-61, 2005.
- [15] V. Blazer, "Bacterial fish pathogens," *Environ Biology of Fishes*, vol. 21, pp. 77-79, 1988.
- [16] K. Pedersen, H. F. Skall, A. M. Lassen-Nielsen, L. Bjerrum, and N. J. Olesen, "Photobacterium damsela subsp damsela, an emerging pathogen in Danish rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), mariculture," *Journal of Fish Diseases*, vol. 32, pp. 465-472, 2009.
- [17] G. Amagliani, E. Omiccioli, F. Andreoni, R. Boiani, I. Bianconi, R. Zaccone, M. Mancuso, and M. Magnani, "Development of a multiplex PCR assay for *Photobacterium damsela* subsp. piscicida identification in fish samples," *Journal of Fish Diseases*, vol. 32, pp. 645-653, 2009.
- [18] G. D. Han JE, Kim JH, Choresca Jr. CH, Shin SP, Baeck GW, Park SC, "Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from zebra shark *Stegostoma fasciatum*," *Korean Journal of Veterinary Research*, vol. 49(1), pp. 35-38, 2009.
- [19] V. Zappulli, T. Patarnello, P. Patarnello, F. Frassinetti, R. Franch, A. Manfrin, M. Castagnaro, and L. Bargelloni, "Direct identification of *Photobacterium damsela* subspecies piscicida by PCR-RFLP analysis," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 65, pp. 53-61, 2005.
- [20] S. K. Smith, D. C. Sutton, J. A. Fuerst, and J. L. Reichelt, "Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* (Love et al.) MacDonell and Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description," *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 41, pp. 529-534, 1991.
- [21] B. Austin and D. A. Austin, "Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish," *Springer London, Limited*, p. 580, 2007.

- [22] D. J. Grimes, J. Stemmler, H. Hada, E. B. May, D. Maneval, F. M. Hetrick, R. T. Jones, M. Stoskopf, and R. R. Colwell, "Vibrio species associated with mortality of sharks held in captivity," *Microbial Ecology*, vol. 10, pp. 271-282, 1984.
- [23] A. J. Rivas, M. Balado, M. L. Lemos, and C. R. Osorio, "The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins *damselysin* and *HlyA* are encoded within a new virulence plasmid," *Infection and Immunity*, vol. 79, pp. 4617-4627, 2011.
- [24] B. Fouz, A. E. Toranzo, M. Milan, and C. Amaro, "Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, pp. 531-535, 2000.
- [25] L. Serracca, C. Ercolini, I. Rossini, R. Battistini, I. Giorgi, and M. Prearo, "Occurrence of both subspecies of *Photobacterium damsela* in mullets collected in the river Magra (Italy)," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 57, pp. 437-440, 2011.
- [26] M. Kanki, T. Yoda, T. Tsukamoto, and E. Baba, "Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 73, pp. 1467-1473, 2007.
- [27] C. R. Osorio, M. D. Collins, A. E. Toranzo, J. L. Barja, and J. L. Romalde, "16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 65, pp. 2942-2946, 1999.
- [28] G. Gauthier, B. Lafay, R. Ruimy, V. Breittmayer, J. L. Nicolas, M. Gauthier, and R. Christen, "Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov.," *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 45, pp. 139-144, 1995.
- [29] W. A. Janssen and M. J. Surgalla, "Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch. (*Roccus americanus*)," *Journal of Bacteriology*, vol. 96, pp. 1606-1610, 1968.
- [30] D. H. Lewis, L. C. Grumbles, and S. McConnell, "Pasteurella-like bacteria from an epizootic in menhaden and mullet in Galveston bay," *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 6, pp. 160-162, 1970.
- [31] B. Magarinos, Y. Santos, J. L. Romalde, C. Rivas, J. L. Barja, and A. E. Toranzo, "Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*," *Journal General Microbiology*, vol. 138, pp. 2491-2498, 1992.
- [32] R. Savan, T. Kono, T. Itami, and M. Sakai, "Loop-mediated isothermal amplification: an emerging technology for detection of fish and shellfish pathogens," *Journal of Fish Diseases*, vol. 28, pp. 573-581, 2005.
- [33] I. Altinok, E. Capkin, and S. Kayis, "Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens," *Veterinary Microbiology*, vol. 131, pp. 332-338, 2008.
- [34] C. O. Cunningham, "Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control," *Aquaculture*, vol. 206, pp. 19-55, 2002.
- [35] P. Gill and A. Ghaemi, "Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review," *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, vol. 27, pp. 224-243, 2008.
- [36] T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase, "Loop-mediated isothermal amplification of DNA," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, p. 63, 2000.
- [37] M. Parida, S. Sannarangaiah, P. K. Dash, P. V. Rao, and K. Morita, "Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases," *Reviews in Medical Virology*, vol. 18, pp. 407-421, 2008.
- [38] Y. Mori, K. Nagamine, N. Tomita, and T. Notomi, "Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 289, pp. 150-154, 2001.
- [39] C. R. Osorio, A. E. Toranzo, J. L. Romalde, and J. L. Barja, "Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 40, pp. 177-183, 2000.
- [40] P. R. Rajan, J. H. Lin, M. S. Ho, and H. L. Yang, "Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* by a PCR technique and plating method," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 95, pp. 1375-1380, 2003.

- [41] C. R. Osorio and K. E. Klose, "A Region of the Transmembrane Regulatory Protein ToxR That Tethers the Transcriptional Activation Domain to the Cytoplasmic Membrane Displays Wide Divergence among *Vibrio* Species," *Journal of Bacteriology*, vol. 182, pp. 526-528, 2000.
- [42] M. Kubista, J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoback, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg, and N. Zoric, "The real-time polymerase chain reaction," *Molecular Aspects Medicine*, vol. 27, pp. 95-125, 2006.
- [43] J. M. Bartlett and D. Stirling, "A short history of the polymerase chain reaction," *Methods in Molecular Biology*, vol. 226, pp. 3-6, 2003.
- [44] F. T. Ishmael and C. Stellato, "Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician," *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma & Immunology*, vol. 101, pp. 437-443, 2008.
- [45] Integrated DNA Technologies, Inc. The Polymerase Chain Reaction [Online]. Available: <http://eu.idtdna.com/site> (Acedido a 20 de Outubro 2013).
- [46] Molecular Biology Insights. OLIGO.net - Primer Analysis Software [Online]. Available: <http://oligo.net/index.html> (Acedido a 22 de Outubro 2013).
- [47] Molecular Biology Insights. Oligo, Primer Analysis Software [Online]. Available: <http://www.oligo.net/contact.html> (Acedido a 22 de Outubro 2013).
- [48] D. P. Koichiro Tamura, Nicholas Peterson, Glen Stecher, Masatoshi Nei and Sudhir Kumar. MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis [Online]. Available: <http://www.megasoftware.net/> (Acedido a 22 de Outubro 2013).
- [49] S. F. Gonzalez, C. R. Osorio, and Y. Santos, "Development of a PCR-based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 55, pp. 109-115, 2003.
- [50] A. Del Cerro, I. Marquez, and J. A. Guijarro, "Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 68, pp. 5177-5180, 2002.
- [51] D. O'Brien, J. Mooney, D. Ryan, E. Powell, M. Hiney, P. R. Smith, and R. Powell, "Detection of *Aeromonas salmonicida*, causal agent of furunculosis in salmonid fish, from the tank effluent of hatchery-reared Atlantic salmon smolts," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 60, pp. 3874-3877, 1994.
- [52] R. Beaz-Hidalgo, G. E. Magi, S. Balboa, J. L. Barja, and J. L. Romalde, "Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene," *Veterinary Microbiology*, vol. 128, pp. 386-394, 2008.
- [53] S. E. Keeling, C. L. Brosnahan, C. Johnston, R. Wallis, N. Gudkovs, and W. L. McDonald, "Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of *Aeromonas salmonicida*," *Journal of Fish Diseases*, vol. 36, pp. 495-503, 2013.
- [54] I. Altinok, J. M. Grizzle, and Z. Liu, "Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 44, pp. 29-34, 2001.
- [55] R. Avendano-Herrera, B. Magarinos, A. E. Toranzo, R. Beaz, and J. L. Romalde, "Species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 62, pp. 75-83, 2004.
- [56] M. M. Blanco, A. Gibello, A. I. Vela, M. A. Moreno, L. Dominguez, and J. F. Fernandez-Garayzabal, "PCR detection and PFGE DNA macrorestriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 50, pp. 19-27, 2002.
- [57] M. L. Myers, G. Panicker, and A. K. Bej, "PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 69, pp. 2194-2200, 2003.
- [58] C. R. Arias, E. Garay, and R. Aznar, "Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 61, pp. 2476-2478, 1995.
- [59] N. Tomita, Y. Mori, H. Kanda, and T. Notomi, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products," *Nature Protocols*, vol. 3, pp. 877-882, 2008.

- [60] T. Song, C. Toma, N. Nakasone, and M. Iwanaga, "Sensitive and rapid detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli by a loop-mediated isothermal amplification method," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 243, pp. 259-263, 2005.
- [61] T. Itano, H. Kawakami, T. Kono, and M. Sakai, "Detection of fish nocardiosis by loop-mediated isothermal amplification," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 100, pp. 1381-1387, 2006.
- [62] M. Okamura, Y. Ohba, S. Kikuchi, A. Suzuki, H. Tachizaki, K. Takehara, M. Ikedo, T. Kojima, and M. Nakamura, "Loop-mediated isothermal amplification for the rapid, sensitive, and specific detection of the O9 group of Salmonella in chickens," *Veterinary Microbiology*, vol. 132, pp. 197-204, 2008.
- [63] Eiken Chemical. Eiken Genome Site [Online]. Available: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/index.html> (Acedido a 8 de Dezembro 2012).
- [64] K. Nagamine, Y. Kuzuhara, and T. Notomi, "Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 290, pp. 1195-1198, 2002.
- [65] K. Nagamine, K. Watanabe, K. Ohtsuka, T. Hase, and T. Notomi, "Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template," *Clinical Chemistry*, vol. 47, pp. 1742-1743, 2001.
- [66] Y. Mori and T. Notomi, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases," *Journal of Infection and Chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, vol. 15, pp. 62-69, 2009.
- [67] Eiken Chemical Co. A Guide to LAMP primer designing (PrimerExplorer V4) - Manual [Online]. Available: [http://primerexplorer.jp/e/v4\\_manual/02.html](http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/02.html) (Acedido a 10 de Dezembro 2012).
- [68] K. Nagamine, T. Hase, and T. Notomi, "Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers," *Molecular and Cellular Probes*, vol. 16, pp. 223-229, 2002.
- [69] Eiken Chemical Co., Ltd. LAMP Primer Designing Software, PrimerExplorer [Online]. Available: [http://primerexplorer.jp/e/v4\\_manual/index.html](http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/index.html) (Acedido a 10 de Dezembro 2012).
- [70] F. Maruyama, T. Kenzaka, N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu, "Detection of Bacteria Carrying the stx2 Gene by In Situ Loop-Mediated Isothermal Amplification," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 69, pp. 5023-5028, 2003.
- [71] R. Osawa, A. Yoshida, Y. Masakiyo, S. Nagashima, T. Ansai, H. Watari, T. Notomi, and T. Takehara, "Rapid detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans using a loop-mediated isothermal amplification method," *Oral Microbiology and Immunology*, vol. 22, pp. 252-259, 2007.
- [72] T. Iwamoto, T. Sonobe, and K. Hayashi, "Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M. avium, and M. intracellulare in Sputum Samples," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, pp. 2616-2622, 2003.
- [73] Y. Misawa, A. Yoshida, R. Saito, H. Yoshida, K. Okuzumi, N. Ito, M. Okada, K. Moriya, and K. Koike, "Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in blood cultures," *Journal of Infection and Chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, vol. 13, pp. 134-140, 2007.
- [74] S. Chen, F. Wang, J. C. Beaulieu, R. E. Stein, and B. Ge, "Rapid detection of viable salmonellae in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 77, pp. 4008-4016, 2011.
- [75] R. Savan, A. Igarashi, S. Matsuoka, and M. Sakai, "Sensitive and Rapid Detection of Edwardsiellosis in Fish by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 70, pp. 621-624, 2004.
- [76] H. Y. Yeh, C. A. Shoemaker, and P. H. Klesius, "Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish Ictalurus punctatus important bacterial pathogen Edwardsiella ictaluri," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 63, pp. 36-44, 2005.
- [77] S. Chen and B. Ge, "Development of a toxR-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting Vibrio parahaemolyticus," *BMC microbiology*, vol. 10, pp. 10-41, 2010.
- [78] A. Kulkarni, C. M. A. Caipang, M. F. Brinchmann, K. Korsnes, and V. Kiron, "Loop-Mediated Isothermal Amplification – An assay for the detection of atypical Furunculosis caused by Aeromonas salmonicida in Atlantic cod, gadus morhua," *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, vol. 17, pp. 476-489, 2009.
- [79] C. G. I. Pepper, T. Gentry, R. Maier, "Environmental Microbiology," *Elsevier Science*, p. 624, 2011.

- [80] P. Martins, D. F. R. Cleary, A. C. C. Pires, A. M. Rodrigues, V. Quintino, R. Calado, and N. C. M. Gomes, "Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*," *PlosOne*, (in press).
- [81] FUJITSU. PrimerExplorer - LAMP primer designing software [Online]. Available: <http://primerexplorer.jp/e/> (Acedido a 14 de Dezembro 2012).
- [82] National Center for Biotechnology Information, NCBI,. GenBank [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (Acedido a 3 de Dezembro 2012).
- [83] R. V. V. Navarro, "Patógenos Bacterianos da Aquacultura," grau de Mestre, Ambiente e Ordenamento; Biologia; Economia, Gestão e Engenharia Industrial; Física; Geociências; Química; Engenharia Civil, Universidade de Aveiro, Repositório Institucional da Universidade de Aveiro, 2012.
- [84] E. S. Abrams, S. E. Murdaugh, and L. S. Lerman, "Comprehensive detection of single base changes in human genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis and a GC clamp," *Genomics*, vol. 7, pp. 463-475, 1990.
- [85] E. A. Rettedal, S. Clay, and V. S. Brozel, "GC-clamp primer batches yield 16S rRNA gene amplicon pools with variable GC clamps, affecting denaturing gradient gel electrophoresis profiles," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 312, pp. 55-62, 2010.
- [86] G. Muyzer and K. Smalla, "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 73, pp. 127-41, 1998.
- [87] S. O. Byun, Q. Fang, H. Zhou, and J. G. Hickford, "An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels," *Analytical Biochemistry*, vol. 385, pp. 174-175, 2009.
- [88] D. J. Colquhoun and H. Sorum, "Cloning, characterisation and phylogenetic analysis of the fur gene in *Vibrio salmonicida* and *Vibrio logei*," *Gene*, vol. 296, pp. 213-220, 2002.
- [89] K. E. Bowenkamp, S. Frasca, Jr., A. Draghi, 2nd, G. J. Tsongalis, C. Koerting, L. Hinckley, S. De Guise, R. J. Montali, C. E. Goertz, D. J. St Aubin, and J. L. Dunn, "Mycobacterium marinum dermatitis and panniculitis with chronic pleuritis in a captive white whale (*Delphinapterus leucas*) with aortic rupture," *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians* vol. 13, pp. 524-530, 2001.
- [90] S. Haldar, S. B. Neogi, K. Kogure, S. Chatterjee, N. Chowdhury, A. Hinenoya, M. Asakura, and S. Yamasaki, "Development of a haemolysin gene-based multiplex PCR for simultaneous detection of *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 50, pp. 146-152, 2010.
- [91] T. A. Griffiths, K. Rioux, and J. De Buck, "Sequence polymorphisms in a surface PPE protein distinguish types I, II, and III of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, pp. 1207-1212, 2008.
- [92] M. Ronaghi, "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing," *Genome Research*, vol. 11, pp. 3-11, 2001.
- [93] P. J. Cummings, R. Ahmed, J. A. Durocher, A. Jessen, T. Vardi, and K. M. Obom, "Pyrosequencing for microbial identification and characterization," *Journal of Visualised Experiments: JoVE*, vol. 22, p. 11, 2013.
- [94] J. B. Patel, "16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory," *Molecular Diagnosis: a journal devoted to the understanding of human disease through the clinical application of Molecular Biology*, vol. 6, pp. 313-321, 2001.
- [95] G. Muyzer, E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden, "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 59, pp. 695-700, 1993.
- [96] B. Diez, C. Pedros-Alio, T. L. Marsh, and R. Massana, "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques," *Applied Environmental Microbiology*, vol. 67, pp. 2942-2951, 2001.
- [97] F. Chapelle, "Ground-Water Microbiology and Geochemistry," *Wiley*, p. 477, 2001.
- [98] A. K. Welsh and R. J. C. McLean, "Characterization of Bacteria in Mixed Biofilm Communities Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)," *Current Protocols in Microbiology*, vol. Supplement 4, p. 17, 2005.

- [99] National Center for Biotechnology Information, NCBI,. Basic Local Alignment Search Tool [Online]. Available: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Acedido a 27 de Novembro 2013).