



Universidade de Aveiro Departamento de Ambiente e Ordenamento
2012

Rafael Vinicius
Valério Navarro

PATÓGENOS BACTERIANOS DA AQUACULTURA

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências do Mar e Zonas Costeiras, realizada sob a orientação científica do Doutor Newton Carlos Marcial Gomes, Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia, CESAM Universidade de Aveiro.

o Júri

Presidente

Professora Filomena Maria Cardoso Pedrosa Ferreira Martins

Professora Associada com Agregação do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Vogal

Professora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (arguente)

Vogal

Professor Doutor Newton Carlos Marcial Gomes

Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia, CESAM Universidade de Aveiro (orientador)

Agradecimentos

A elaboração do presente estudo foi uma experiência a ser guardada como ensinamento, pois ajudou-me a rever conceitos, valorizar e programar o tempo para os projetos futuros de vida.

Gostaria de agradecer primeiramente ao Professor Newton Carlos Marcial Gomes, por me ceder a oportunidade de elaboração deste projeto, dispondo de suas horas de trabalho para orientar-me e coordenar-me até sua conclusão, além de conselhos preciosos e claros para objetivar e ponderar situações de vida.

Agradecer ainda aos pesquisadores e pessoas do laboratório, que disponibilizaram seu tempo para me auxiliar na elaboração das pesquisas e confecção deste trabalho (Sonia, Francisco, Patrícia, Rossana, Ana Rita).

Agradecer o projeto AQUASAFE (Desenvolvimento de novas tecnologias para antecipar e diagnosticar surtos de doenças na aquicultura) no âmbito do PROMAR e do Fundo Europeu das Pescas.

Agradecer a alguns amigos por me proporcionarem momentos de alegria no período em que estive longe da família, tais como Paulo, Marco, Nuno, Andreia, Tiago, Jorge, Andreia Maia, Elizabete, Catarina, Cristiana, Carol entre outros que não tem o nome aqui citado, mas que foram de certa forma colaboradores para o meu bem-estar moral.

Agradecer muito aos meus pais por proporcionarem e sustentarem-me durante esta oportunidade única de estudar fora de meu país, além de agradecer aos meus avós, tios e tias por colaborarem no mesmo sentido. Sem estas pessoas eu nunca seria quem sou.

Agradecer ao meu irmão pela parceria e por me fazer dar boas risadas nos momentos em que ele estava livre para falar comigo. Agradecer aos meus primos, sempre queridos, adorados e bem-humorados ao se dirigirem à minha pessoa. Além de agradecer a Raika, meu cão, que também me traz excepcionais momentos de alegria.

E finalmente, de forma especial, agradecer à minha namorada Iara, por fornecer todo o seu apoio, incentivo, suporte intelectual e carinhoso para a conclusão deste trabalho.

Palavras-chave Bactérias patogénicas; Aquacultura; Métodos moleculares.

Resumo

A aquacultura é uma técnica usada a milhares de anos pelo homem para cultivo de organismos aquáticos (China - 2000 anos A.C.), dos quais ele usufrui de seus benefícios. Esta técnica de produção de alimento, na maior parte das vezes associada aos ambientes costeiros, é hoje altamente requisitada e impulsionada pelo elevado consumo de grande parte da população mundial, uma vez que, os estoques pesqueiros explorados pelo homem ao redor do globo apresentam indícios de declínio (super explorados ou totalmente explorados). Em virtude das elevadas taxas de consumo de pescado *per capita* atuais (9,9 Kg em 1960 para 17,2 Kg em 2009), a aquacultura é uma alternativa para a manutenção da oferta de pescado no futuro, sendo sua implantação uma ação recorrente em diversos países, expandindo as fronteiras do setor aquícola. Esta rápida expansão e as elevadas densidades utilizadas em cultivos, acabam por originar riscos e perigos à sanidade dos animais e do consumidor final de seus produtos. Estes riscos estão associados a potenciais doenças e infecções ocasionadas pela atuação de microrganismos patogénicos bacterianos, que constantemente vem assolando cultivos de diversas espécies. Estes microrganismos patogénicos comumente encontrados em aquacultura, e principalmente os analisados no presente estudo são caracteristicamente células gram-negativas, causadores de vibriose (*Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus* e *Photobacterium damsela* subsp *damsela*) e photobacteriose (*Photobacterium damsela* subsp *piscicida*), sendo estas, umas das mais importantes doenças pelo impacto económico associado. Para a obtenção de diagnóstico e controle rápido destes distúrbios associados aos agentes etiológicos em questão, são necessários métodos inovadores eficazes de alta sensibilidade, com o intuito de mitigar elevados prejuízos ao setor. Dentre estas técnicas, a mais utilizada é a Polymerase Chain Reaction (PCR) e suas variantes, que utilizam fragmentos genéticos de bactérias alvo para sua rápida detecção. Essas técnicas utilizam iniciadores filogenéticos (primers) que delimitam as áreas específicas do genoma bacteriano a ampliar, permitindo detetar a presença desta em uma determinada amostra. O presente trabalho visa reportar os procedimentos elaborados para a sintetização de novos primers para a indentificação específica de subespécies de *Photobacterium*. Os resultados apesar de negativos para a identificação e amplificação do material genómico das duas subespécies, deve ser melhor estudado, com o intuito de testar a sua especificidade.

Keywords Pathogenic bacteria; **Aquaculture**; Molecular methods.

Abstract Aquaculture is a technique used for thousands of years by man for cultivation of aquatic organisms (China - 2000 BC). This technique of food production most often associated with coastal environments, is currently highly requested and driven by high consumption of the world population. Since fish stocks exploited by humans around the globe show a decline (over-exploited or fully exploited). Given the high current rates of fish consumption *per capita* (9.9 kg in 1960 to 17.2 kg in 2009), aquaculture is an alternative to maintaining the supply of fish in the future. This rapid expansion and the high densities used in crops, eventually imposes risks for the health of animals and for the human (final consumer). These risks are associated with potential diseases and infections caused by the action of bacterial pathogens, which are frequently plaguing crops of various species. These pathogens here analyzed, are characteristically gram-negative bacteria, which causing vibriosis (*Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus*, and *Photobacterium damsela* subsp *damsela*) and photobacteriosis (*Photobacterium damsela* subsp *piscicida*), which are the most important diseases and they are major causative of economical losses in the aquaculture. To obtain a quick diagnosis and provide management tools for the control of disorders associated with the referred infectious agents, effective, sensitive and innovative methods are needed in order to mitigate heavy losses to the industry. Among these techniques, the most widely used is the Polymerase Chain Reaction (PCR) and their variations, using genetic sequences of these bacteria to their early detection. These techniques use phylogenetic primers (primers) for amplifying specific areas of the bacterial genome, thus determining the presence of specific pathogens in a given sample. The present paper reports the procedures developed for the synthesis of new primers for the specific identification of subspecies of *Photobacterium*. The results despite the negativity, for identifying and amplifying the genomic material of the two subspecies should be further studied in order to test their specificity.

Índice

Resumo	
<i>Abstract</i>	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
Plano geral de dissertação	1
1.Introdução	2
1.1.Aquacultura	3
1.2.Doenças e microrganismo patogénicos bacterianos	11
1.2.1.<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	17
1.2.2.<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	19
1.2.3.<i>Vibrio anguillarum</i>	22
1.2.4.<i>Vibrio salmonicida</i>	24
1.2.5.<i>Vibrio vulnificus</i>	26
1.3.Importância das técnicas moleculares	28
1.3.1.Primers (Iniciadores)	32
1.3.2.Desenho de primers	33
2.Material e Métodos	35
2.1.Experiências laboratoriais informáticas	35
2.1.1.Gene <i>ToxR</i>	35
2.1.2.Softwares e validação dos primers	36
2.1.3.Primers sintetizados escolhidos	36
2.2.Experiências laboratoriais empíricas	38
2.2.1.Protocolo de "validação" bacteriana em PCR	38
2.2.2.Procedimento e protocolo de PCR	40
3.Resultados	48
3.1.Vertente bioinformática	48
3.2.Vertente laboratorial	49
3.3.Verificação das duas subespécies bacterianas	49
3.4.Procedimentos de PCR	51

4.Discussão.....	54
5.Conclusão.....	56
6.Referências.....	58

Lista de Tabelas

Tabela 1. Produção Mundial da Pesca e da Aquacultura e sua utilização.

Tabela 2. Produção Aquícola por região: quantidade e percentagem da produção mundial.

Tabela 3. Programa de PCR para confirmação da funcionalidade do material genómico das bactérias analisadas.

Tabela 4. Substâncias utilizadas no PCR para cada uma das bactérias e o programa do termociclador a que foram submetidas.

Tabela 5. Substâncias utilizadas no PCR para cada uma das bactérias e o programa do termociclador a que foi submetido o DNA puro das duas bactérias analisadas.

Tabela 6. Substâncias utilizadas no PCR para o 4^o e 5^o procedimentos e o programa do termociclador a que foram submetidos.

Lista de Figuras

Figura 1. Produção pesqueira de captura: principais áreas de pesca marinha em 2008.

Figura 2. Elementos para a obtenção de uma Aquacultura sustentável.

Figura 3. Modelo dos três anéis de Sneizko, modificado de forma ilustrativa, ressaltando a interação dos hospedeiros, agentes patogénicos e o ambiente.

Figura 4. Diferentes estratégias de bactérias patogénicas para evitarem defesas imunológicas (Wilson *et al.*, 2002).

Figura 5. *Vibrio anguillarum*.

Figura 6. Bactéria *Vibrio salmonicida* em microscopia eletrónica.

Figura 7. *Vibrio vulnificus* em microscopia eletrónica.

Figura 8. Etapas dos ciclos realizados na PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) de forma meramente esquemática.

Figura 9. Distribuição das devidas quantidades de "MIX" e de DNA por tubos de reacção de PCR com o auxílio de micropipetas, dentro da AURA PCR.

Figura 10. Termociclador utilizado para os procedimentos de PCR, marca Applied Biosystems, modelo Veriti (96 Well Thermal Cyclor).

Figura 11. Fonte de estímulos elétricos utilizada para os procedimentos de Electroforese em Gel, marca CBS scientific, modelo EPS 300 IIV.

Figura 12. Gel e poços elaborados para a realização de Electroforese gel.

Figura 13. Equipamentos de visualização dos resultados da Electroforese, ChemiDoc™ XRS+ System Image Lab™ da marca BIORAD.

Figura 14. Validação e pontuação de alinhamento com as sequências analisadas das subespécies de *Photobacterium*.

Figura 15. Amplificação positiva para as subespécies da bactéria *Photobacterium*.

Figura 16. 1º e 2º PCR, a cima e a baixo respectivamente, utilizando os dois pares de primers.

Figura 17. Segundo procedimento de PCR com DNA puro das duas subespécies bacterianas estudadas.

Figura 18. Terceiro procedimento de PCR utilizando DNA puro e DNA diluído da subespécie *damselae*.

Figura 19. Quarto procedimento de PCR, utilizando células lisadas a 100°C das duas subespécies e a utilização do DNA diluído da subespécie *piscicida*.

Figura 20. Quinto procedimento de PCR, utilizando as células lisadas a 100°C e o DNA puro apenas da subespécie *damselae*.

Plano geral de dissertação

O conteúdo do estudo nesta presente tese intitulada por "patógenos bacterianos da aquacultura", inclui a contextualização do estado atual da aquacultura e das pescas a nível mundial. O estudo foca de forma particular, os microrganismos patogénicos e as doenças de origem bacteriana mais relevantes em aquacultura, bem como a utilização dos métodos moleculares existentes para sua detecção, com o intuito de desenvolver primers universais elaborar novos protocolos de aplicação de métodos moleculares de deteção.

Esta dissertação está estruturada em 6 capítulos. No primeiro capítulo, é feita uma introdução aos ambientes marinhos, a sua relação com o homem enquanto fonte de recursos bem como os problemas decorrentes da sua má utilização, contendo também alguns subcapítulos reportando as doenças bacterianas e os agentes patogénicos estudados, além da importância das técnicas moleculares. No segundo capítulo é abordado todos os materiais e equipamentos utilizados para o desenvolvimento do estudo além da descrição metodológica. O terceiro capítulo aborda os resultados obtidos nas vertentes bioinformática e laboratorial.

O quarto capítulo aborda algumas discussões em comparação com outros estudos da área. No quinto capítulo são apontadas algumas conclusões a cerca dos resultados

Já no sexto e último capítulo são listadas as referências bibliográficas.

1.Introdução

Atualmente mais de 50% da população mundial vive a menos de 60km do litoral, prevendo-se que dentro de duas décadas, essa percentagem atinja os 75% (Dias *et al.*, 2009). Essa estreita faixa de território corresponde, apenas, a menos de 10% do espaço habitável existente na Terra (Dias *et al.*, 2009) e esta área de características atrativas e distintas, hospeda 75% das megalópoles com mais de 10 milhões de habitantes e produz cerca de 90% da pesca global. Esta área é importante na produção de alimentos, de desenvolvimento industrial e de transporte, fonte de recursos minerais como hidrocarbonetos (petróleo e gás natural) e abundante reservatório de biodiversidade e ecossistemas, dos quais depende o funcionamento do planeta.

Abordada como fonte de produção de alimentos nas áreas costeiras, a aquicultura gera produtos que representam benefícios de suma importância para as populações. Porém, a esta atividade estão associados riscos químicos e biológicos:

Pesticidas e contaminantes: nos últimos anos aquicultura tem sofrido diversos danos devido a intensa utilização de agroquímicos, prejudicando os organismos aquáticos e o meio ambiente. Estes compostos químicos vêm contaminando rios, lençóis freáticos e sistemas aquícolas como as pisciculturas (Arias *et al.*, 2007). Os mesmos compostos, se acumulam na carne dos peixes e moluscos por resíduos de pesticidas e substâncias tóxicas de efluentes industriais que alteram a qualidade do pescado, contaminando o alimento (Fda, 1989), mesmo através de breves exposições ao contaminante, o que acarreta sérios problemas no ciclo de vida dos animais (Dutra *et al.*, 2009), sendo que os efeitos adversos podem degradar à saúde humana (consumidor) dependendo do perfil toxicológico do produto empregado (Delgado & Paumgartten, 2004).

Fármacos da aquicultura: usados no controle de pragas e prevenção de doenças, melhoria na reprodução e razão de crescimento e também usados como calmantes durante o transporte dos animais. Substâncias estas que podem

ser carcinogênicas, alergênicas ou causarem desenvolvimento de resistência a antibióticos em microrganismos patogênicos para o homem (FDA, 1994).

Bactérias patogênicas: agentes bacterianos que constituem perigo biológico, contaminando os produtos da aquacultura, como durante o processamento e sanitização do pescado (Sawyer & Pestka, 1985). São conhecidas contaminações pelas seguintes bactérias: *Aeromonas sp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e de alguns vibrios, tais como, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*.

O presente estudo teve como objectivos gerais realizar um levantamento bibliográfico da actual situação das pescas e da aquacultura mundial, realizar levantamentos bibliográficos sobre os microrganismos patogênicos bacterianos mais frequentes e que causam as maiores perdas económicas em sistemas de aquacultura, e reportar a importância das técnicas moleculares para o diagnóstico e identificação dos patógenos bacterianos;

Como objectivos específicos o presente estudo visou, o desenvolvimento (design) de novos marcadores filogenéticos (primers) e de protocolos moleculares para duas subespécies da bactéria patogênica *Photobacterium* (*Photobacterium damsela subsp. damsela* e *Photobacterium damsela subsp. piscicida*).

1.1. Aquacultura

No início dos anos 70, a FAO (Food and Agriculture Organization), realizou uma compilação de estudos efetuados por Gulland (1971), apresentou um panorama do potencial de captura de pescado marinho (excluindo invertebrados) em torno de 100 milhões de toneladas. No entanto, este mesmo autor considerou improvável que todas as ações piscatórias pudessem ser exploradas a níveis ideais, alterando a sua primeira previsão para cerca de 80 milhões de toneladas. Dadas estas perspectivas na década de 70, em 1996, a captura de pescado marinho alcançou o auge, com 74,4 milhões de toneladas. A

partir disto, outros levantamentos e compilações de dados fornecidos para a compreensão das capturas marinhas de 1990 a 2000, reportaram um rápido declínio da pesca em todo o mundo (FAO, 2008).

Segundo a FAO, áreas do oceano Atlântico como o Noroeste, Nordeste e Centro-Oeste alcançaram o auge de exploração nos anos de 2004, 2001 e 2000 respectivamente, diminuindo progressivamente nos anos posteriores em 13, 23 e 30% respectivamente em cada área. Outro caso que chama atenção é a drástica diminuição na captura nos mares Mediterrâneo e Negro de 12% no período de um ano (2007 para 2008). Já no Oceano Pacífico os referidos declínios ocorreram na porção Nordeste (2006, EUA e Canadá), Sudoeste e nas porções orientais do Pacífico central (Hilborn, 2007).

De acordo com estes resultados levantados pela FAO, há pouca dúvida de que as pescas no mundo estão em declínio. Até os anos 50, as capturas das pescas a nível mundial (marinhas e dulçaquícolas) aumentaram em média 6% ao ano. Porém, a partir de 1960 notou-se que a expansão de uma economia em rápido desenvolvimento carecia de novos recursos para continuar a atender a crescente população mundial, de hábitos cada vez mais consumistas. Já na década de 70, o cenário de recessão internacional e a crise petrolífera, transmitiram um importante sinal para alertar o mundo sobre os limites dos recursos energéticos e de matérias-primas (Valenti, 2000).

Este declínio das capturas totais revela que aparentemente o máximo explorável dos recursos aquáticos, foi atingido para a maioria dos estoques e que, em alguns casos, foram ultrapassados os níveis suportados pelas espécies, como, por exemplo, o bacalhau (Reis, 2010).

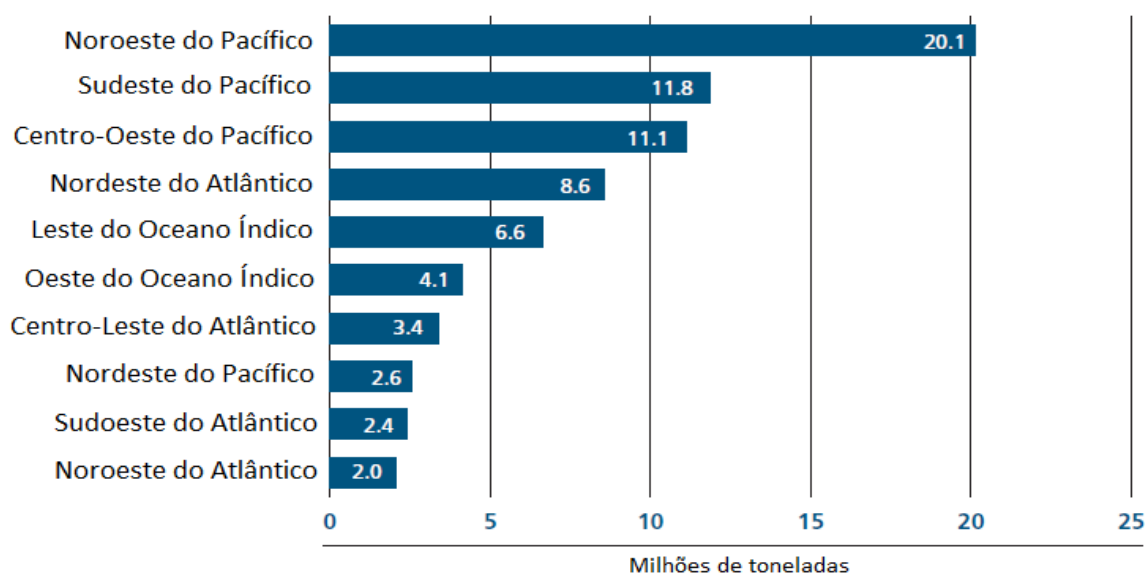
A modalidade de produção pesqueira por captura tem estabilizado em cerca de 90 milhões de toneladas anuais, com algumas variações. As estatísticas preliminares para 2008 e as estimativas para 2009 confirmam a estimativa citada anteriormente de suprimentos globais da pesca de captura (FAO, 2010). Isso está de acordo com o padrão observado nos últimos 15 anos, ao longo dos quais a captura total anual oscilou numa faixa de 85 a 95 milhões de toneladas (Nomura,

2010). Sendo assim, cada vez mais, a aquicultura e a piscicultura, oferecem uma solução alternativa e complementar para atender a demanda crescente por frutos de origem marinha e ou dulçaquícola.

Diante do relatório feito pela FAO (2008), com dados levantados pelo Departamento de Pesca e da Aquicultura, mostram os estados dos recursos de captura de pescado, sendo relevante que, **“em 2007, cerca de 30% dos recursos pesqueiros mundiais estavam super explorados ou esgotados, (19%) super explorados, (8%) esgotados ou em recuperação apenas (1%) e, portanto, não utilizou-se todo o seu potencial devido a excessiva pressão da pesca”**.

As áreas com maior risco de super exploração, ou que já se encontram completamente esgotadas são as seguintes: Nordeste do Atlântico, o lado Oeste do Oceano Índico e o Noroeste do Pacífico, dados que corroboram com a figura 1, que demonstra as áreas de captura de pescado mais exploradas (FAO, 2008).

Produção pesqueira de captura: principais áreas de pesca marinha em 2008



Nota: As áreas de pesca listados são aqueles com uma produção de pelo menos 2 milhões de toneladas.

Figura 1. Produção pesqueira de captura: principais áreas de pesca marinha em 2008. Adaptado de FAO, 2010.

Conforme definido pela *Food and Agriculture Organization* (FAO), a aquacultura é "o cultivo de organismos aquáticos, incluindo peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas" caracterizando-se pela intervenção do Homem no ciclo biológico das espécies produzidas e na manipulação de massas de água naturais e ou artificiais, com o intuito de realizar a comercialização de produtos exigidos na alimentação humana (Henriques, 1998; Freitas, 2001; Martín *et al.*, 2005). Esta instituição reporta que a aquacultura é originária de países da Ásia, com origem na China, há mais de 2000 anos, posteriormente introduzida na Europa durante a idade média, entre os séculos XII e XIV, através da realização de cultivos de carpa comum (*Cyprinus carpio*) que posteriormente veio a se difundir por todo o mundo. Alguns dados da instituição acima citada mostram que a produção mundial de pescado e da aquacultura em 2006, atingiu conjuntamente aproximadamente 140 milhões de toneladas, dos quais 110 milhões foram destinados ao consumo humano. No total, mais de 300 espécies são criadas em aquacultura. No entanto, apenas cerca de 40 são economicamente significativas (Nutreco, 2011).

Atualmente, a aquacultura corresponde a grande parte da oferta mundial de pescado, e a sua contribuição, para o abastecimento de produtos de origem marinha certamente aumentará no futuro próximo (Nomura, 2010), com potencial para tornar-se uma atividade sustentável. Porém, o desenvolvimento insustentável desta atividade pode exacerbar problemas já existentes e criar problemas novos, prejudicando ecossistemas, como as áreas costeiras.

A aquacultura é vista como uma atividade importante no setor de produção de alimentos, que fornece uma fonte alternativa de alimento animal de rápido crescimento, e com o crescente "boom" populacional, estima-se que sejam necessários a produção de mais de 40 milhões de toneladas de pescado até o ano de 2030 para satisfazer o consumo mundial actual por habitante (FAO, 2006b). Porém, segundo uma avaliação publicada pela AIBS – *American institute of biological science* (2009), a produção aquícola de produtos do mar permanecerá, provavelmente como o sistema de produção de alimentos mais

rápido do mundo somente até 2025. Isto mostra que, de acordo com as estimativas anteriores, o fornecimento de pescado para consumo humano depende diretamente da actividade de aquacultura e seu desenvolvimento (Naylor *et al.*, 2000).

Com a forte expansão da procura por produtos pesqueiros, o requerimento de pescado em todo o mundo já supera a oferta, elevando o preço de diferentes tipos de pescado, provenientes da actividade piscatória. As principais razões para o aumento da procura e dos preços são: variação do fornecimento e do valor de comercialização de pescado de país para país (culturas e hábitos alimentares diferentes), a disponibilidade de peixe e outros alimentos, o nível socioeconómico, a sazonalidade da produção de algumas espécies e a quantidade de consumo de peixe *per capita* que varia entre países (Chammas, 2007).

Dados relatam que a aquacultura foi a actividade que mais se desenvolveu no setor de produção de alimentos à escala mundial, correspondendo aproximadamente a 50% da produção de peixe mundial (FAO, 2009). Estima-se ainda que o consumo *per capita* de peixe à escala mundial, aumentou de forma constante a partir de uma média de 9,9 kg em 1960 até 11,5 kg em 1970, 12,5 kg em 1980 a 14,4 kg em 1990, 16,4 kg em 2005 chegando finalmente em 2009 a uma oferta aparente *per capita* de 17,2 Kg (FAO, 2010; Nomura, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1. Produção mundial da pesca e da aquacultura e sua utilização. Adaptado de FAO, 2010.

	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Milhões de Toneladas						
PRODUÇÃO						
INTERIOR						
Captura	8.6	9.4	9.8	10.0	10.2	10.1
Aquacultura	25.2	26.8	28.7	30.7	32.9	35.0
Total	33.8	36.2	38.5	40.6	43.1	45.1
MARINHO						
Captura	83.8	82.7	80.0	79.9	79.5	79.9
Aquacultura	16.7	17.5	18.6	19.2	19.7	20.1
Total	100.5	100.1	98.6	99.2	99.2	100.0
TOTAL CAPTURA	92.4	92.1	89.7	89.9	89.7	90.0
TOTAL AQUACULTURA	41.9	44.3	47.4	49.9	52.5	55.1
TOTAL MUNDIAL DE PESCADO	134.3	136.4	137.1	139.8	142.3	145.1
UTILIZAÇÃO						
Consumo Humano	104.4	107.3	110.7	112.7	115.1	117.8
Uso não alimentar	29.8	29.1	26.3	27.1	27.2	27.3
População (Bilhões)	6.4	6.5	6.6	6.7	6.8	6.8
Quantia de pescado <i>per capita</i> (Kg)	16.2	16.5	16.8	16.9	17.1	17.2

Nota: Excluindo as plantas aquáticas. Os dados de 2009 são estimativas provisórias.

Concomitante ao seu rápido desenvolvimento e a expansão de seus domínios para o cultivo de organismos, a aquacultura, seja ela de forma intensiva (reduzidas áreas e elevadas densidades de peixe), ou extensiva (grandes áreas e baixas densidades de peixes), acaba por corresponder a um acréscimo de matéria orgânica nos sistemas aquáticos, gerando problemas ambientais e tornando certas áreas semi anóxicas (depleção de oxigénio dissolvido), sobretudo quando há emprego de alimentação artificial. Por outro lado, atividades como a aquacultura, contribuem para melhorias no equilíbrio entre a pesca predatória e manutenção dos estoques pesqueiros, realizando a libertação de recrutas para o ambiente natural, recompondo o estado da população de algumas espécies, para que se mantenham as ofertas aos consumidores (Henriques, 1998).

Nas condições atuais da aquacultura mundial a Ásia manteve-se dominante, representando cerca de 88,8% da produção mundial e 78,7% do valor de vendas de produtos desta atividade. A China é ainda o país líder em aquacultura, responsável por cerca de 62% da produção mundial. Porém, apesar de todo o desenvolvimento e crescimento do setor, este não se desenvolveu de forma homogênea por todo o globo, como se pode ver na Tabela 2.

Tabela 2. Produção Aquícola por região: quantidade e percentagem da produção mundial. Adaptado de FAO, 2010.

Grupos selecionados e países		1970	1980	1990	2000	2006	2008
África	(toneladas)	10 271	26 202	81 015	399 788	754 406	940 440
	(percentagem)	0.40	0.60	0.60	1.20	1.60	1.80
África sub-sahariana	(toneladas)	4 243	7 048	17 184	55 802	154 905	238 877
	(percentagem)	0.20	0.10	0.10	0.20	0.30	0.50
África do Norte	(toneladas)	6 028	19 154	63 831	343 986	599 501	701 563
	(percentagem)	0.20	0.40	0.50	1.10	1.30	1.30
América	(toneladas)	173 491	198 850	548 200	1 422 637	2 367 320	2 405 166
	(percentagem)	6.80	4.20	4.20	4.40	5.00	4.60
Caribe	(toneladas)	350	2 329	12 169	39 692	36 610	40 054
	(percentagem)	0.00	0.00	0.10	0.10	0.10	0.10
América Latina	(toneladas)	869	24 590	179 367	799 235	1 640 001	1 720 899
	(percentagem)	0.00	0.50	1.40	2.50	3.50	3.30
América do Norte	(toneladas)	172 272	171 931	356 664	583 710	690 709	644 213
	(percentagem)	6.70	3.70	2.70	1.80	1.50	1.20
Ásia	(toneladas)	1 786 286	3 540 960	10 786 593	28 400 213	41 860 117	46 662 031
	(percentagem)	69.60	75.20	82.50	87.60	88.40	88.80
Ásia excluindo China	(toneladas)	1 021 888	2 211 248	4 270 587	6 821 665	11 831 528	13 717 947
	(percentagem)	39.80	47.00	32.70	21.00	25.00	26.10
China	(toneladas)	764 380	1 316 278	6 482 402	21 522 095	29 856 841	32 735 944
	(percentagem)	29.80	28.00	49.60	66.40	63.10	62.30
Oriente médio	(toneladas)	18	13 434	33 604	56 453	171 748	208 140
	(percentagem)	0.00	0.30	0.30	0.20	0.40	0.40
Europa	(toneladas)	510 713	770 200	1 616 287	2 072 160	2 209 097	2 366 354
	(percentagem)	19.90	16.40	12.40	6.40	4.70	4.50
Não países da UE (+ Chipre e Israel)	(toneladas)	39 431	49 985	582 305	676 685	925 664	1 088 594
	(percentagem)	1.50	1.10	4.50	2.10	2.00	2.10
Países da UE (27)	(toneladas)	471 282	720 215	1 033 982	1 395 475	1 283 433	1 277 760
	(percentagem)	18.40	15.30	7.90	4.30	2.70	2.40
Oceania	(toneladas)	8 421	12 224	42 005	121 312	160 126	172 214
	(percentagem)	0.30	0.30	0.30	0.40	0.30	0.30
Mundo	(toneladas)	2 566 882	4 705 841	13 074 100	32 416 110	47 351 066	52 546 205

O aumento e transformação dos processos envolvidos na atividade aquícola, colocam novos riscos, designadamente a suscetibilidade às doenças infecciosas (problemas de saúde pública) aos animais vulneráveis a zoonoses, e os perigos ambientais decorrentes das práticas de cultivo e da má gestão de espécies exóticas que podem competir por alimento e espaço com as espécies nativas, além de introduzir patógenos e parasitas (Smith *et al.*, 2005; Tundisi, 2006), prejudicando as comunidades ecológicas de peixes em uma escala sequencial na cadeia trófica alimentar (Harris *et al.*, 2005). Os ecossistemas podem assim, sofrer alterações no seu funcionamento. Estas questões têm gerado preocupações de biossegurança (gestão de riscos biológicos) e têm motivado a promoção de uma aquacultura sustentável (Arthur *et al.*, 2009). Entende-se aqui o termo sustentável como um modelo económico, político, social, cultural e ambiental equilibrado, capaz de satisfazer as necessidades das gerações do presente, não comprometendo as de gerações futuras, no caso, o acesso ao pescado (Figura 2).

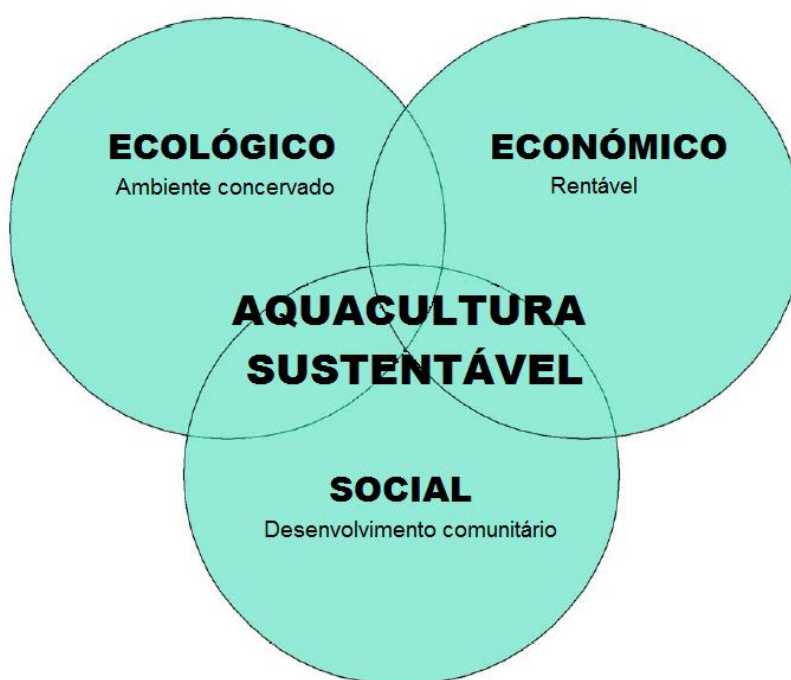


Figura 2. Elementos para a obtenção de uma Aquacultura sustentável. Adaptado. Fonte: SeaWeb, 2004.

A dinâmica da ocorrência, gravidade e da propagação de doenças em sistemas de aquicultura se assemelham aos padrões observados as doenças em populações de humanos e animais silvestres, sendo a água no caso dos peixes, um facilitador da propagação de agentes patogénicos causadores de doenças (Nicholson, 2006).

1.2. Doenças e microrganismos patogénicos bacterianos

Os animais cultivados em sistemas de aquicultura vivem aparentemente uma vida saudável na presença de diversos agentes patogénicos bacterianos. Em geral, apesar das bactérias serem comumente associadas a doenças, elas também desempenham um papel essencial nos ciclos biogeoquímicos fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de animais e plantas, bem como a produtividade potencial e manutenção de um ecossistema (Ehrlich, 1997), e no bem-estar humano. Da-se hoje grande importância à identificação de microrganismo patogénicos e visa-se até o desenvolvimento de estratégias de controlo adequadas para o seu gerenciamento (Cullimore, 2010).

Praticamente todas as espécies de bactérias causadoras de doenças em peixes são, na realidade, saprófitas que são parte integrante da microbiota natural dos ambientes (Ostrensky & Boeger, 1998). Portanto, mudanças na capacidade de resistência a doenças dos peixes é que possibilitam que essas espécies causem epidemias em cultivo. No entanto, nem todas as bactérias são propriamente consideradas como microrganismos patogénicos primários (capazes de infectar hospedeiros sãos), pois muitos destes patógenos são oportunistas (microrganismos patogénicos secundários), causando doenças em hospedeiros já debilitados (Austin & Austin, 2007). O processo de enfraquecimento dos animais pode estar relacionado com variações ambientais bruscas (ex: temperatura), poluição do meio aquático (ex: pesticidas, fármacos e resíduos industriais) ou a um estadio fisiológico natural do indivíduo, associado ao seu ciclo de vida (ex: fase reprodutiva).

Muitas patologias têm surgido em áreas geograficamente diferentes ou em áreas onde não se havia declarado a sua existência. Possivelmente estes novos relatos são devidos à importação da tecnologia de cultivo de peixes, estando possivelmente infectados, ou ainda a má implantação e adequação da tecnologia da aquacultura, o que indica um controle sanitário inadequado em transações comerciais de peixes (Arrojado, 2009).

A sanidade dos animais aquáticos é portanto um aspecto extremamente importante durante à sua produção comercial. Os riscos iminentes relativos a ocorrência de doenças são potencialmente elevados de forma proporcional à densidade de animais em cultura e tem efeito direto na sobrevivência e na desenvoltura de crescimento da espécie cultivada (Jobling, 1994). A presença de um grande número de peixes numa pequena área de cultivo (geralmente não natural), eleva as condições de estresse e isso acaba por facilitar a propagação de infecções (Nicholson, 2006). Outros fatores associados ao aumento do risco de surtos e de doenças podem ser a quantidade de excremento produzido e residente no sistema aquático, bem como as intervenções de manutenções e transporte frequentemente realizados em tanques de aquacultura. Estas alterações geradas dentro do sistema de cultivo (temperatura, salinidade, ambiente poluído e o incorreto fornecimento do alimento dado aos peixes) geram flutuações dos parâmetros de qualidade da água, afetando o sistema imunológico dos peixes deixando-os suscetíveis ao ataque de agentes patogénicos, culminando em doença (Almeida *et al.*, 2009).

Os princípios da aquacultura e as medidas para controle de doenças infecciosas recorrentes na mesma são uma da outra, uma contradição direta, uma vez que a aquacultura visa a maximização dos lucros através do cultivo de cada vez mais animais em volumes de água cada vez menores, com elevada densidade populacional. Antagonicamente a isso, as medidas de combate às doenças implicam em densidades populacionais baixas, evitando que ocorra uma nova fase de infeção, passada de um peixe para outro (ciclo). Consequentemente, os problemas relacionados com estes tipos de doenças

tendem a amplificarem-se na produção aquícola já que os lucros prevalecem (Owens, 2003).

Para o entendimento de alguns dos princípios causadores de doenças, pode-se observar o "*modelo dos três anéis*", que representa as interações existentes entre o hospedeiro (espécie cultivada), o agente patogénico (bactérias para o presente estudo) e o ambiente (susctível a alterações físico-químicas), principais pilares de sustentação de um cultivo em aquacultura (Figura 3).

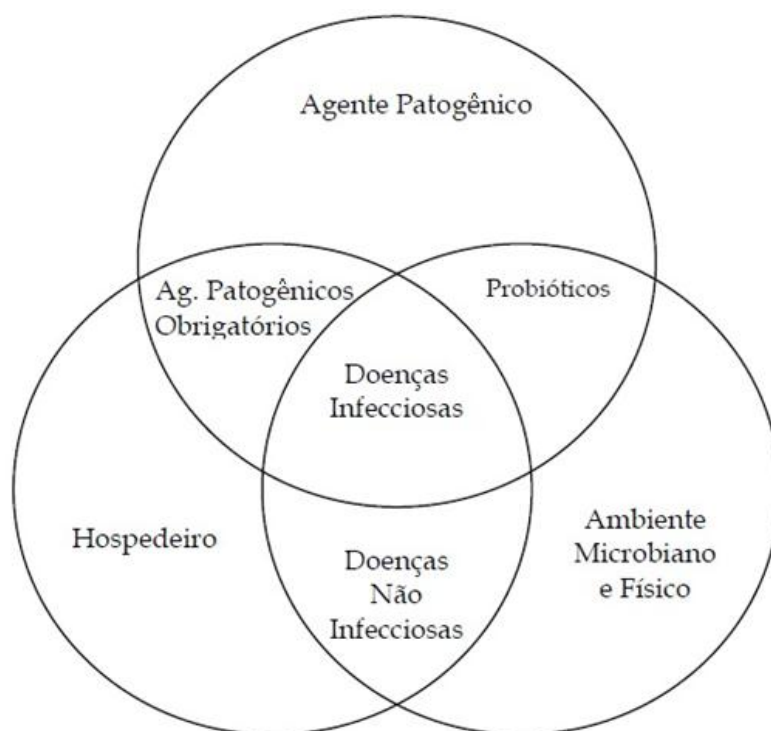


Figura 3. Modelo dos três anéis, modificado de forma ilustrativa, ressaltando a interação dos hospedeiros, agentes patogénicos e o ambiente. Fonte: Owens, 2003.

A partir do momento em que o agente etiológico se encontra instalado após um episódio de infeção, seja ele direto (microrganismo patogénico primário) ou em um caso de imunodepressão (microrganismo patogénico secundário), dentro e ou na superfície externa do hospedeiro, a infeção pode suceder de três formas possíveis, são elas:

- O agente prolifera, gerando a morte do hospedeiro;

- O hospedeiro supera a infecção e elimina o agente patogénico ou,
- O hospedeiro evolui para o estado de portador, estabelecendo-se um equilíbrio entre hospedeiro e agente patogénico.

A maior preocupação em aquacultura surge quando ocorre a multiplicação rápida do agente patogénico dentro do hospedeiro e o perigo de transmissão (novos ciclos) para outros indivíduos da população, resultando numa possível epidemia. Esta transmissão de doença ou infecção pode dar-se sem manifestações sintomáticas, tornando-se difíceis de serem notadas, até que condições ambientais de stresse elevado exacerbem os sintomas da doença (Pillay & Kutty, 2005). Por isto, o estudo das infecções bacterianas dos peixes é difícil, pois muitas vezes não há uma compreensão adequada das interações entre as bactérias, os seus hospedeiros e o ecossistema aquático (Roberts, 2004).

No decorrer da incubação (intervalo entre a penetração ou estabelecimento do microrganismo patogénico e os sinais da doença) o hospedeiro tenta livrar-se do agente patogénico. Após esta etapa de eliminação, não havendo a eliminação completa do microrganismo patogénico, inicia-se a fase de portador. Nesta fase o peixe pode disseminar o agente patogénico no ambiente ou mante-lo latente, não liberando-o para o ambiente externo. Dessa maneira, após a etapa clínica da infecção, alguns indivíduos podem continuar ou não a disseminar o agente patogénico (Pillay & Kutty, 2005).

Um dos fatores determinantes nas relações entre microrganismo patogénico e o hospedeiro é a virulência ou patogenicidade do microrganismo. Por exemplo, as bactérias portadoras de flagelo de cápsulas estão melhor adaptadas para invadir o hospedeiro e responder a ataques do sistema imunitário do animal. Algumas destas bactérias são capazes de sintetizar neurotoxinas ou toxinas hemorrágicas devastadoras para a condição dos animais infetados (Pillay & Kutty, 2005).

Problemas como o surgimento de novas linhagens ou estirpes bacterianas patogénicas multiresistentes aos antibióticos empregados usualmente

para seu controle, geram preocupação devido a sua rápida difusão, sendo necessário a elaboração de novos métodos ou alternativas quanto ao manejo e controle de patogênicos de peixes (Schnick, 1988; Hoffman, 1974). Dessa forma, inovações como a utilização de técnicas moleculares, tem sido mencionadas como uma alternativa potencialmente viável para detectar e diagnosticar surtos de doenças, prevenindo perdas com tratamentos de carácter antimicrobiano (Cassel, 2001).

Por conseguinte, bactérias com poder patogénico causador de doenças em produtos da aquacultura merecem ser vistas com maior importância para que se possa prevenir possíveis consequências no âmbito da saúde pública, principalmente em comunidades onde o consumo de peixe cru ou mal cozido é um hábito cultural.

As bactérias gram-negativas são os principais microrganismos patogênicos bacterianos. Possuem parede celular com camadas complexas (lipoproteica, membrana externa e lipopolissacarídea), que lhes garante proteção contra alguns antibióticos e respostas do sistema imunitário, permitindo sua sobrevivência em ambientes considerados “hostis”. São exemplos deste grupo: *Photobacterium damsela subsp. damsela* (anteriormente *Vibrio damsela*), *Photobacterium damsela subsp. piscicida* (anteriormente *Pasteurella piscicida*), *Vibrio (Listonella) anguillarum*, *Vibrio (Aliivibrio) salmonicida* e *Vibrio vulnificus* (Meyer, 1991; Shao, 2001; Olafsen, 2002; Toranzo *et al.*, 2005, Magaraggia *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2009).

Existem vários mecanismos e factores de virulência que permitem às bactérias sobreviver ao ataque do sistema imunitário, assim como várias formas pelas quais o sistema imunitário atua contra os agentes patogênicos (Figura 4).

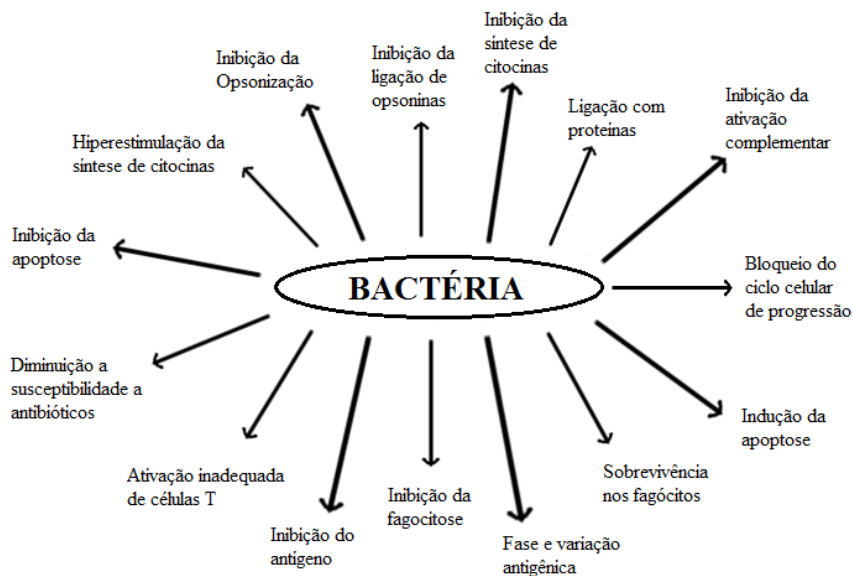


Figura 4. Diferentes estratégias de bactérias patogénicas para evitarem defesas imunológicas. Fonte: Wilson *et al.*, 2002.

A *vibriose* e a *photobacteriose* são duas doenças bacterianas consideradas as mais importantes em sistemas de cultivo marinhos, estuarinos e, ocasionalmente, de água doce. Estas doenças são as causadoras dos maiores impactos já observados em aquacultura. A *vibriose* é causada por espécies do género *Vibrio* (*Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus*) e *Photobacterium* (*Photobacterium damsela subsp damsela*). Os sintomas clínicos apresentados por peixes com esta doença são a letargia, a lentidão do crescimento, e necrose dos tecidos do apêndice, opacidade muscular (Moriarty, 1997; Defoirdt *et al.*, 2007), septicemia com presença de hemorragia na base das barbatanas, exoftalmia e opacidade da córnea (Toranzo *et al.*, 2005). A *Photobacteriose* por sua vez é causada pela bactéria halofílica *Photobacterium damsela subsp piscicida* que possui elevada patogenicidade e afeta uma grande variedade de espécies de peixes (Toranzo *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2009).

Causam altos níveis de mortalidade podendo atingir até 100% do cultivo em aquacultura.

1.2.1. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

De acordo com Thyssen & Ollevier (2005), *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* pertence ao gênero *Photobacterium*, que está incluído na família *Vibrionaceae*, exibindo cocobacilos, características morfológicas típicas dos membros da família.

De acordo com o reportado por Austin & Austin (2007), esta bactéria foi primeiramente identificada como "Vibrio marinho sem nome" e em 1971, foi isolado como o agente causador infeccioso num caso envolvendo humanos. Mais tarde, este organismo foi isolado de úlceras da pele de *Chromis punctipinnis*, (em inglês, Blacksmith). Estas lesões na barbatana peitoral e no pedúnculo caudal eram comumente observadas nos períodos de verão e outono, nas águas costeiras do sul da Califórnia, onde um levantamento realizado das populações de peixes selvagens levaram a conclusão de que as úlceras eram restritas às espécies de "Castanheta" (em inglês, Damselfish). Conseqüentemente a esta constatação, o nome atribuído a este microrganismo patogénico bacteriano inicialmente foi *Vibrio damsela* (Love *et al.*, 1981). No ano de 1985, este microrganismo patogénico foi atribuído ao gênero *Listonella* como *Listonella damsela*, e com base em estudos de moleculares de DNA/RNA (5S), geneticistas e fenotipistas sugeriram que esta linhagem bacteriana estava intimamente relacionada com espécies do gênero *Photobacterium*, sendo atribuído à bactéria o nome de *Photobacterium damsela* (Smith *et al.*, 1991).

Em 1995, a análise da sequência genômica de um agente patogénico de peixe anteriormente chamado *Pasteurella piscicida* (Jansen & Surgalla, 1968), em comparação com a base de dados de hibridização DNA-DNA, sugeriram que essa espécie estava estreitamente relacionada com a bactéria *Photobacterium damsela*, sendo ambos os organismos classificados como uma mesma espécie, distinguindo-os a partir de então através de categorias de subespecies (Gauthier

et al., 1995). Assim, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* compreende as estirpes que se encaixam dentro da descrição de *Pasteurella piscicida*, enquanto que as estirpes que possuem as características de *Vibrio damsela* são classificadas como *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

Estas duas subespécies distinguem-se pelas características fenotípicas, incluindo as condições ótimas de crescimento de temperatura e de salinidade, sua mobilidade, produção de gás, bem como algumas propriedades enzimáticas e bioquímicas tais como a redução do nitrato, urease, lipase, amilase e hemólise (Fouz *et al.*, 1992). Apesar desta rápida distinção que pode ser feita entre as duas subespécies de *Photobacterium damsela*, estas também mostram, um elevado grau de semelhança genética em geral em testes de hibridação cromossômica de DNA (Gauthier *et al.*, 1995) possuindo sequências idênticas do gene ribossomal 16S RNA (Osório *et al.*, 1999).

As espécies de *Photobacterium* estão amplamente distribuídas em ambientes marinhos e têm sido frequentemente isoladas a partir de água do mar, dos sedimentos, de órgãos bioluminescentes (simbiose) de peixes, da superfície e de intestinos de animais marinhos saudáveis, bem como a partir dos órgãos de animais marinhos doentes, e até de seres humanos. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* são patogênicos para diversas espécies marinhas. Porém entre todas as espécies do gênero *Photobacterium*, apenas *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* possui potencial patogênico para homeotérmicos, incluindo os seres humanos (Liu, 2011).

Este agente patogênico caracteriza-se por ser um agente patogênico primário causador de infecções em feridas e septicemia hemorrágica em diferentes espécies de peixes selvagens como damselfish, tubarão, pregado (Fouz *et al.*, 1991, 1992), dourada, pargo-rosa, arraia, peixe-gato, bem como em peixes cultivados em aquacultura.

Foi constatado que estirpes patogênicas da bactéria *P. damsela* podem infectar novos hospedeiros (peixes) através da água, e a propagação da doença

depende amplamente da temperatura e da salinidade da água de cultivo (Fouz *et al.*, 2000). As estirpes virulentas podem sobreviver em água do mar com temperaturas variando de 14°C - 22°C, sendo ainda cultiváveis e mantendo sua infecciosidade durante longos períodos de tempo (Fouz *et al.*, 2000), apresentando sazonalidade. Sendo assim, o ecossistema aquático pode ser considerado como reservatório natural de estirpes virulentas, e as infecções transmitidas através da água com a presença desta subespécie de *Photobacterium*, representam ameaça para os animais marinhos e seres humanos.

A maioria das infecções relatadas em humanos associadas a *Photobacterium damsela* *subsp. damsela* têm sua origem em feridas infectadas durante o manuseamento de peixes ou após a exposição à água do mar ou ao ambiente marinho em geral (lagunas, estuários) (Liu, 2011).

1.2.2. *Photobacterium damsela* *subsp. piscicida*

A sub-espécie *Photobacterium damsela* *subsp. piscicida* foi isolada inicialmente na Baía de Chesapeake, Virginia, durante o verão de 1963 numa epidemia descrita nas espécies Robalo-do-norte e Robalo-muge, sendo o agente infeccioso classificado como *Pasteurella* com base em suas características morfológicas e bioquímicas (Snieszko *et al.* 1964). Estudos subsequentes realizados por Janssen e Surgalla (1968) sugeriram para esta linhagem, o nome de *Pasteurella piscicida*. Desta forma, a doença causada por estas bactérias foi chamada de "photobacteriose" ou "pseudotuberculose".

No entanto, estudos de hibridização e análises filogenéticas mostraram evidências de que a *Pasteurella piscicida* estaria estreitamente relacionada com a família *Vibrionaceae* e não deveria ser classificada no gênero *Pasteurella* (De Ley *et al.*, 1990). Estes resultados, foram posteriormente confirmados pela sequenciação de genes de 16S rRNA, proporcionando evidências mais concretas de que *Pasteurella piscicida* está altamente relacionada com a bactéria, *Photobacterium damsela*, anteriormente classificada como *Vibrio damsela*. Foi

então proposto que o organismo deveria ser reposicionado taxonomicamente numa nova subespécie, como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Gauthier *et al.*, 1995).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* é uma bactéria gram negativa, caracteristicamente halofílica obrigatória, que consegue crescer em concentrações de NaCl (Cloreto de Sódio) de 0.5% a 4.0%, e temperaturas entre 15 a 32.5°C (Snieszko *et al.*, 1964). Estas bactérias, na fase logarítmica de crescimento, podem aparecer em cadeias, sendo mais longas e em forma de haste em fases posteriores, podendo tornar-se cocobacilos (Hawke, 1996). A descrição clássica de *Photobacterium damsela* inclui cocobacilos não capsulados (Koike *et al.*, 1975). Porém, estudos posteriores relatam que a maioria das estirpes de *Photobacterium damsela* constitutivamente produzem material capsular que desempenham uma papel importante e fundamental na patogênese deste microrganismo (Bonet *et al.*, 1994).

A *photobacteriose* foi responsável por grandes perdas nos cultivos de Menhadem e Tainha-olhalvo em Galveston Bay, no Texas (Lewis *et al.*, 1970). No entanto, é no Japão que a doença tornou-se de considerável importância econômica, causando perdas significativas nos viveiros de Yellowtail (Egusa, 1983). Desde o seu reconhecimento inicial nos cultivos Yellowtail, a *Photobacteriose*, parece ter se espalhado para outras espécies de peixes, incluindo Dourada (Balebona *et al.*, 1998), Imperadores (Yasunaga *et al.*, 1983), *Hephaestus fuliginosus* (Ohnishi *et al.*, 1982), Atum (Mladineo *et al.*, 2006) e Linguado-branco.

No Japão, esta doença parece ocorrer entre o verão e o outono, quando as temperaturas da água rondam entre 20-25 °C, o mesmo foi relatado em um surto de *photobacteriose* na Espanha, no meio da estação de verão, onde a temperatura da água rondava aproximadamente 25 °C (Austin & Austin, 2007). Entretanto, não há muita informação sobre a transmissão desta doença. Estudos anteriores sugerem que a bactéria não aparenta sobreviver na água do mar, por períodos maiores do que 3-5 dias (Janssen & Surgalla, 1968; Toranzo *et al.*, 1982).

Alguns estudos indicam que a doença causada pela bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* pode ter contaminado populações de peixes selvagens e cultivadas em regiões do Mediterrâneo na década de 1990, nomeadamente Croácia, França, Itália (Ceschia *et al.*, 1991; Doimi *et al.*, 1991), Espanha (Toranzo *et al.*, 1991; Magariños *et al.*, 1992; Mladineo *et al.*, 2006), Grécia (Baudin Laurencin *et al.*, 1991; Bakopoulos *et al.*, 1995) e Portugal (Baptista *et al.*, 1996), sendo também reportada sua presença em outras regiões fora do Mediterrâneo como EUA (Janssen e Surgalla, 1968), Japão (Kimura e Kitao, 1971), Taiwan (Tung *et al.*, 1985) e na Noruega (Speilberg *et al.*, 1991).

Essencialmente, a *Photobacteriose* caracteriza-se por ser uma septicemia que, em casos considerados agudos, demonstra apenas alguns sinais clínico-patológicos. As manifestações mais severas afetam órgãos internos como rim e baço, onde as colônias bacterianas desenvolvem coloração branco-acizentada (Kusuda e Yamaoka, 1972) e o material purulento gerado pela infecção pode acumular-se na cavidade abdominal (Lewis *et al.*, 1970).

Estudos realizados por Hawke (1996), revelaram que as epidemias de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* em cultivos de híbridos da espécie Robalo-muge geralmente resultaram em taxas de mortalidade de 5 a 90% dependendo da qualidade da água e do tratamento empregado no cultivo. Já nas epidemias relatadas na primavera, podem ocorrer mortalidades súbitas, chegando a 80% de todo o cultivo em 10 dias, sendo o início da mortalidade tão rápida (poucos ou nenhum sinal clínico de aviso) que a infecção se estabelece nos peixes cultivados antes que a terapia possa ser iniciada (Hawke, 1996).

O estudo da infecção dos organismos em tanques de cultivo ao ar livre e em tanques abrigados revelou que as mortalidades ocorriam apenas no tanque exterior (ao ar livre), havendo variações de temperatura, com ausência de mortalidades em tanques abrigados, podendo assim, ser concluído que as variações bruscas de temperatura da água que atenuam a imunidade dos peixes, são um ponto importante em surtos de *photobacteriose* (Hawke, 1996). Variações estas que possivelmente proporcionaram a colonização por outros

microrganismos patogénicos oportunistas (secundários), resultando na mortalidade encontrada.

1.2.3. *Vibrio anguillarum*

São bacilos gram-negativos, possuindo oxidase positiva, anaeróbios facultativos, halofílicos e podem estar presentes em águas marinhas, estuarinas e continentais. Inicialmente posteriormente a seu isolamento foram descritos cerca de 20 espécies do género *Vibrio* e em torno de 70 espécies são conhecidas actualmente (Holt *et al.*, 1994). Ao género *Vibrio* pertencem microrganismos patogénicos facultativos de origem ambiental ou de hospedeiros assintomáticos animais. São comumente isolados de superfícies mucosas e de órgãos internos de peixes clinicamente sadios, como também de invertebrados, sedimentos e coluna d'água. São altamente adaptados ao meio e estão presentes em águas poluídas e com salinidade alta (Noga, 1996). Espécies como *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio anguillarum* são reconhecidamente patogénicas para peixes, sendo outras conhecidas espécies de vibrios parte constituinte da microbiota natural da água, porém são considerados microrganismo patogénicos oportunistas, contaminando os peixes e causando enfermidades (Shaperclaus, 1992).

A infeção é conhecida como "*praga* ou *peste vermelha*" e referida historicamente como "*pestis rubra anguillarum*" e "*anguillarum erypelosis*" (Austin & Austin, 2007).

Esta doença causou perdas catastróficas em cultivos marinhos de enguias realizadas na Itália durante os séculos XVIII e XIX, sendo sua excelente descrição em um surto da "*peste vermelha*" em enguias durante o ano de 1718, sem dúvida, a primeira referência a uma doença bacteriana de peixes na literatura europeia (Bonaveri, 1761).

O agente etiológico causador da "*peste vermelha*" de enguias foi isolado e designado como *Bacterium anguillarum*. Posteriormente, um caso de surto

envolvendo enguias na Suécia durante o ano de 1907, foi atribuído à bactéria estudada o nome de *Vibrio anguillarum* (Austin & Austin, 2007).

Vibrio anguillarum é membro da microbiota natural do ambiente aquático segundo alguns autores (West e Lee, 1982; Muroga *et al*, 1986), estando particularmente vinculado à presença de metazoários, especificamente rotíferos (Mizuki *et al.*, 2006). A ocorrência de grandes surtos bacterianos gerados por este vibrio ocorre durante os meses mais quentes do ano, principalmente o verão (Austin & Austin, 2007). Já no inverno são reportados poucos casos (Larsen, 1982). Estas epidemias bacterianas também ocorrem geralmente devido a elevada densidade de animais presentes nos tanques de aquacultura e pelas condições de poluição do local de cultivo (Anderson & Conroy, 1970).

Posteriormente à classificação do organismo como *Vibrio anguillarum*, o taxon foi reclassificado como gênero *Listonella*, com o novo nome de *Listonella anguillara*, de acordo com o proposto por MacDonell e Colwell (1985). No entanto a reclassificação e renomeação da bactéria não foi amplamente aceite, permanecendo a classificação proposta anteriormente, com o nome *Vibrio anguillarum* (Fig. 5). Esta espécie é considerada a mais comum entre os microrganismos patogênicos de peixes (Símon *et al.*, 1996). Os sintomas de infecção apresentados são similares aos causados por *Aeromonas*, e caracterizados por ulcerações na pele do animal afetado e infecções que ocorrem principalmente em órgãos ricos em ferro, como o baço e rim (Austin & Austin, 2007). Também podem ser apresentados como sinais clínicos de infecção a distensão abdominal, um quadro de anemia e hemorragia subcutânea (Noga, 1996).

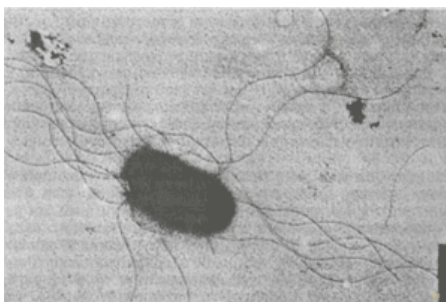


Figura 5. *Vibrio anguillarum*. Fonte: <http://pisciculture.ru/action/disease?id=252>.

A forma exata de como se estabelece a infecção gerada por este microrganismo ainda é desconhecida, mas, sabe-se que envolve a colonização do hospedeiro com posterior penetração dos tecidos corporais. A infecção dá-se provavelmente pela colonização do trato gastro-intestinal, facto este corroborado por estudos que relatam a adesão de *Vibrio anguillarum* às seções intestinais da truta arco-íris e posteriormente ocorre a infecção do fígado, baço, músculos e por fim as guelras (Austin & Austin, 2007).

A doença causada por *Vibrio anguillarum* pode ser considerada como uma doença que gera septicemia hemorrágica, em que os peixes afetados aparentam uma descoloração cutânea, presença de necroses de coloração avermelhada na musculatura abdominal, eritemas (manchas de sangue) na base das barbatanas, ao redor do ânus e da boca, podendo apresentar um quadro de exoftalmia (Anderson & Conroy, 1970). Partindo do exame histológico do exemplar infectado, detetam-se alterações patológicas no sangue, tecido conjuntivo, branquias, rim, fígado (anemia), inchaço do baço e por fim do trato gastro intestinal posterior. As células deste agente patogénico estão distribuídas de forma homogênea ao longo dos tecidos infectados, apresentando porém, maior concentração de células no sangue (Tajima *et al.*, 1981; Ransom *et al.*, 1984).

1.2.4. *Vibrio salmonicida*

Vibrio salmonicida é o agente causador da "*Doença de Hitra*". Esta bactéria tem por características incluir estirpes de organismos anaeróbicos facultativos que possuem mobilidade exercida por vários flagelos polares (Egidius *et al.*, 1986). Trata-se de uma bactéria halofílica que cresce melhor no intervalo de concentração de cloreto de sódio (NaCl) de 0,5 a 4,0 %, sendo um organismo psicrófilo (organismos capazes de sobreviver a condições extremamente adversas e se reproduzir em baixas temperaturas). Pode crescer no intervalo de

temperatura de 1°C a 22°C, sendo sua temperatura ótima de crescimento variando de 12°C a 15°C (Austin & Austin, 2007).

A "*Doença de Hitra*" apareceu em 1977 e ocorreu pela primeira vez em larga escala em 1979 em aquaculturas na ilha norueguesa de Hitra. Esta doença causou perdas substanciais em culturas localizadas ao longo da costa ocidental e norte da Noruega (Egidius *et al.*, 1981). No entanto, alguns surtos individuais também foram relatados na Escócia (Bruno *et al.*, 1985, 1986), nas Ilhas Faroe (Dalsgaard *et al.*, 1988), New Brunswick, Nova Escócia e Canadá (Sorum *et al.*, 1992). A doença geralmente afeta cultivos de peixes como o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), afeta o bacalhau cultivado e ocasionalmente a truta-arco-íris na Noruega (Sorum *et al.*, 1990).

Esta doença também é conhecida como "*Síndrome Hemorrágica*" ou "*Vibriose de água fria*" e apresenta como características clínicas sinais de anemia, hemorragia, septicemia generalizada e grandes quantidades de células do microrganismo patogénico causador da doença no sangue do peixe infectado ou recentemente morto (Austin & Austin, 2007).

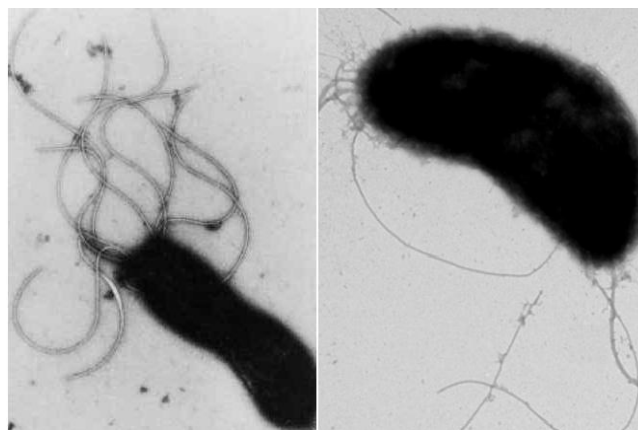


Figura 6. Bactéria *Vibrio salmonicida* em microscopia electronica. Fonte: Egidius *et al.*, 1986 & American Society for Microbiology e Hanne Winther Larsen (New findings about cold-water vibriosis in farmed salmon) respectivamente).

O *Vibrio salmonicida* (Figura 6), pode ser isolado a partir de sedimentos obtidos de tanques de cultivos em que os peixes haviam contraído vibriose. Porém, anteriormente ao surto (7 meses) constou-se que os peixes do local analisado eram livres da doença (Hoff, 1989), podendo as bactérias estarem presentes e serem isoladas dos sedimentos dos cultivos de tanques marinhos livres da doença. Esta bactéria não foi detectada em sedimentos em que não são realizados os cultivos. Porém, foram isoladas a partir de fezes de peixe infectados experimentalmente, sugerindo que esta estirpe de vibrio poderia estabelecer-se ou estar presente nos sedimentos através dos excrementos gerados pelos peixes, permanecendo nestes locais por muito tempo. Estas bactérias que se encontram nos sedimentos, ao presenciarem uma situação favorável para seu desenvolvimento, poderiam gerar surtos nos cultivos seguintes (Enger *et al.*, 1989). Além disto, como já relatado neste estudo tópicos acima, os peixes "saudáveis" podem exercer a condição de agentes transportadores, contribuindo para disseminação da bactéria no ambiente de cultivo e no ambiente marinho.

1.2.5. *Vibrio vulnificus*

No período entre 1975 e 1977, houve em varias localidades do território Japonês, surtos de doenças em enguias cultivadas (Muroga *et al.*, 1976; Nishibuchi & Muroga, 1977, 1980). Através de análises e amostragens dos animais infectados, foram isoladas várias estirpes similares de bactérias. Há indícios de que esta doença foi introduzida no continente Europeu através da Espanha (Biosca *et al.*, 1991; Amaro *et al.*, 1992). Os sinais clínicos desta doença até então não estudada eram de uma condição hemorrágica, que gera uma vermelhidão corpórea, principalmente na lateral e na cauda dos peixes em casos avançados. Podem ser observadas ainda alterações patológicas no trato gastro intestinal, brânquias, coração, fígado e baço (Miyazaki *et al.*, 1977).

A primeira descrição da bactéria causadora destes surtos de doença, *Vibrio vulnificus*, foi publicada por Baumann em 1973, em um estudo de caracter taxonômico sobre bactérias marinhas. Esta designação atual, *Vibrio vulnificus*, foi designada quando da descrição de estirpes de vibrio que apresentavam reação

positiva para a lactose, onde apurou-se que as estirpes em análise eram fenotipicamente e geneticamente distintas às de *Vibrio vulnificus* (Austin & Austin, 2007).

Esta espécie tem como características ser uma bactéria gram-negativa e ubíqua dos ambientes marinhos e estuarinos, e é considerada um dos microrganismo patogênicos mais perigosos transmitidos pela água. A patogenicidade do *Vibrio vulnificus*, assim como de outras bactérias, resulta da habilidade deste organismo iniciar uma doença, que envolve a sua entrada, sua colonização e a sua multiplicação no hospedeiro (Castro-Silva, 2003).

Existem dois principais factores que são determinantes para que se de a ocorrência e a densidade/concentração (temperatura e salinidade) de *Vibrio vulnificus* num determinado local no ambiente marinho. A temperatura constitui o principal fator, apresentando forte correlação positiva com a temperatura da água, sendo o intervalo de temperatura de 15°C a 30°C considerado ideal para o seu estabelecimento (Wright *et al.*, 1996; Hoi *et al.*, 1998; Motes *et al.*, 1998; Oliver *et al.*, 2005), As maiores concentrações ocorrem quando a temperatura da água excede os 20°C (Austin & Austin, 2007). Este organismo porém, já foi isolado em baixas temperaturas (Hoi *et al.*, 1998).

Como os peixes apresentam no seu intestino elevada atividade metabólica e temperatura mais elevada, em relação à água circundante, este é um habitat perfeito para o estabelecimento do *Vibrio vulnificus*, já que sua ecologia é determinada pela temperatura. Desta forma, as altas concentrações desta espécie encontradas em intestinos de peixes, podem ser importantes para a sua sobrevivência em situações adversas e para a sua reintrodução no ambiente aquático, quando este se torna novamente favorável (Tamplin, 1994).

O outro fator determinante é a salinidade. As espécies patogênicas de *Vibrio* por serem halofílicas, ocorrem com maiores frequências em águas onde a salinidade varia de 5 a 30 (West, 1989; Motes *et al.*, 1998). Este fator mostra-se determinante em até 10% da variação sazonal das densidades encontradas deste vibrio em diferentes localidades (Hoi *et al.*, 1998).

Sob condições de estresse o microrganismo patogénico *Vibrio vulnificus*, apresenta algumas estratégias de sobrevivência designadamente a associação com organismos superiores, a associação com os sedimentos, e a entrada no estado Viável Mas Não Cultivável (VMNC) (Montanari *et al.*, 1999).

Vibrio vulnificus é considerada a espécie mais perigosa em termos de saúde pública, devido às altas taxas de mortalidade (60% dos casos) de pacientes não tratados ou susceptíveis (Dechet *et al.*, 2005; Cdc, 2012). As infecções adquiridas e ocasionadas por esta bactéria ocorrem através da alimentação, quando da ingestão de frutos do mar contaminados (crus ou mal cozidos), ou através da contaminação de lesões por água do mar com presença de tal bactéria (Hlady & Klontz, 1996).

1.3.Importância das técnicas moleculares

Desde os anos 40, com a evolução da biologia molecular acompanhada do aumento das tecnologias para análise de ácidos nucleicos (DNA/RNA), houve uma revolução na investigação biológica. Essa tecnologia e a sua implementação apresentaram uma oportunidade ímpar para a detecção directa do agente patogénico, detectando imediatamente alterações e variações genómicas, possibilitando o discernimento e reconhecimento de subespécies e estirpes (bacterianas, virais ou fúngicas), “substituindo” procedimentos usados até então como técnicas de serologia e histologia (Wagener, 1997; McKeever e Rege, 1999). No entanto a diferença principal entre estas abordagens, é que a primeira técnica visa o cultivo das células bacterianas e sua posterior identificação e classificação, enquanto a segunda técnica, visa amplificar a sequência de DNA característica de uma única célula ou material diretamente.

Dentre os avanços podem-se citar a contribuição para a investigação das doenças de peixes nos últimos anos, onde a partir desta evolução constante de métodos moleculares, proporcionou-se um acelerado desenvolvimento dos diagnósticos de doenças de cultivos. Estas técnicas de grande relevância incluem a Polymerase Chain Reaction (PCR) e suas vertentes, muito usadas na

amplificação de materiais nucleotídicos, sondas de hibridização e sequenciação. Técnicas que são potencialmente mais rápidas e sensíveis do que os métodos comumente usados e já citados. A PCR, foi desenvolvida por Saiki e aprimorada por Kary Mullis nos anos 80, permitindo amplificar mais de um 10^9 vezes regiões específicas de DNA (Kubista *et al*, 2006). O princípio desta técnica é relativamente simples: um fragmento de DNA alvo de tamanho delimitado por dois primers específicos (Forward e Reverse) é amplificado pela DNA polimerase termo-estável amplificando uma sequência de nucleótidos, possibilitando descobrir pormenores sobre a identidade do material da amostra original (McBeath *et al.*, 2000) (Figura 8).

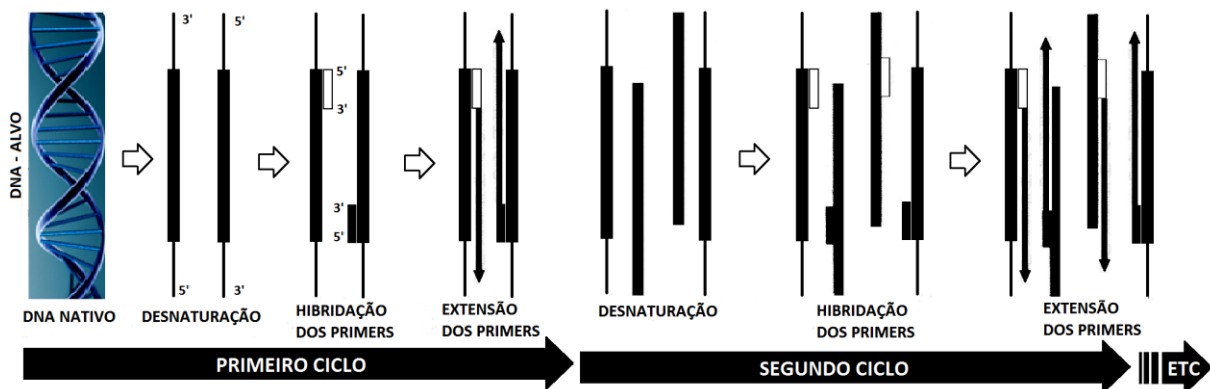


Figura 8. Etapas dos ciclos realizados na PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) de forma meramente esquemática.

Geralmente, o emprego da técnica de PCR e suas vertentes tem como objetivo, analisar a presença ou a ausência, de um determinado microrganismo patogénico bacteriano de forma específica em uma amostra, o que torna o procedimento complexo. No entanto, estas técnicas que utilizam a transcriptase reversa, não conseguem distinguir se o material alvo da pesquisa se encontra em uma célula bacteriana viável, morta ou apenas com o seu DNA livre no ambiente (Josephson *et al.*, 1993). Vale referir, que para os casos de DNA livre, o mesmo pode manter-se em uma amostra ambiental por períodos significativos posterior à sua liberação das células bacterianas degradadas (Lorenz & Wackernagel, 1987, 1992; Romanowski *et al.*, 1993).

Durante os diagnósticos envolvendo a PCR, um dos termos mais usados para a técnica é a sensibilidade. Este termo usado para descrever a menor quantidade do organismo alvo dentre os vários presentes na amostra (amostras ambientais), que pode ser detectado de forma fiável. Para os setores de epidemiologia e de saúde pública o termo empregado, sensibilidade da PCR, caracteriza-se da seguinte forma: “proporção de verdadeiros positivos que são detectados” (Thrusfield, 1986).

Durante a aplicação destes métodos, cientistas reportam alguns problemas, principalmente associados à técnica de PCR. Estes problemas tem ocorrido devido a escolha do material analisado de peixes, que podem conter substâncias que induzem a técnica ao erro, tal como a hemoglobina, alguns componentes bacterianos e concentrações excessivas de DNA não alvo, inibindo a amplificação correta (Hoie *et al.*, 1997; Wilson, 1997), o que pode ter um impacto significativo nos resultados do diagnóstico.

Outra limitação notada por alguns autores quanto a técnica da PCR é de que quando a amostra contem um número excessivo de células alvo ($> 10^6$), a técnica não exhibe respostas, sendo este colapso de informação considerado catastrófico em casos de diagnóstico (Barry *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1992; Niederhauser *et al.*, 1992; Oyofe & Rollins, 1993), podendo gerar falsos-negativos. Por isso, além da escolha adequada do método para o desenvolvimento da análise, o pesquisador detentor dos resultados da PCR, deve estar ciente das condições de todo o procedimento, sendo capaz de distinguir falsos-negativos.

Outro facto que atrai a atenção de pesquisadores e que tem sido motivo de debate é se quando as bactérias patogénicas encontram-se no estado não cultivável, são capazes de manterem-se virulentas ao mesmo nível de uma célula em crescimento ativo (Linder & Oliver, 1989; Oliver & Backian, 1995; Biosca *et al.*, 1996; Jiang & Chai, 1996), gerando dúvidas aos produtos de amplificação da PCR quanto a virulência do microrganismo, o que denota outra lacuna em métodos moleculares e demonstra a necessidade do aperfeiçoamento das técnicas.

Quanto a técnica da PCR utilizada na gestão de fazendas de cultivos de peixes, os critérios de validação dos métodos são menos rigorosos que os laboratoriais, pois a intenção é de comparar os dados obtidos de um determinado local com os de outros cultivos já analisados, prevendo através desta comparação, a probabilidade de ocorrência de uma doença ou de um possível surto, cabendo aos responsáveis pela gestão, tomar as decisões de prevenção. Deste modo, pode dizer-se que a presença de uma bactéria patogénica específica é apenas um fator de um número de fatores que devem coincidir para que ocorra a doença (Smith, 1997).

Para que isto ocorra, um dos elementos chave na validação dos procedimentos de qualquer técnica baseada na PCR, visando sua aplicação no campo, é estabelecer o grau de certeza da técnica, tendo como pressuposto os sinais positivos gerados em detrimento da presença da célula alvo. Os produtos gerados da PCR e as sondas específicas de DNA utilizadas atualmente, geram grande interesse quanto a detecção de bactérias patogénicas, pois as amplificações resultantes devem ser específicas (Hiney, 1997) e possibilitar o seu estudo aprofundado.

Uma das vertentes da PCR, denominada por Multiplex-PCR, pode ser definida como uma reação de amplificação simultânea de múltiplas regiões alvo de DNA, pela adição de um ou mais pares de primers (iniciadores) na mistura de reação. Deste modo, mais de um fragmento genómico é amplificado em uma única reação, cada um com o seu respectivo par de primers específicos, tornando-se possível a detecção de um pacote de agentes patogénicos bacterianos simultaneamente. O desenho e otimização dos primers usados nesta vertente da PCR são um enorme desafio, já que os pares de primers são inseridos de uma só vez na reação, passando por todas as etapas de emparelhamento (*annealing*), sem interferirem uns com os outros, amplificando corretamente as áreas esperadas (Butler *et al.*, 2001). Já o método Nested-PCR é utilizado para melhorar a especificidade e a eficácia da reação, onde em primeiro momento ocorre a amplificação de grande parte do fragmento genómico, realizando cópias de sequências que estão localizadas fora do gene alvo e

posteriormente, utiliza-se o produto elaborado da primeira reação para uma amplificação real da sequência alvo desejada.

Dito isto, com o decorrer do tempo e do avanço citado, houve um refinamento no diagnóstico e melhoria na administração de doenças que atingem os cultivos. Previamente aos avanços e mesmo ao advento dos métodos moleculares de hoje, os diagnósticos de uma doença, eram dependentes da realização de culturas dos microrganismos patogênicos e de várias outras análises, que requeriam substanciais quantias de tempo até um parecer fiável, sendo isto, a causa de grandes perdas económicas para grandes cultivos com surtos de epidemias bacterianas. Porém, apesar de promissores resultados, estas técnicas ainda não foram totalmente incorporadas as legislações de sanidade e manejo de peixes, sendo o presente momento para tal acção, tornando-se necessário a compreensão de lacunas no conhecimento e manuseio das presentes ferramentas para diagnósticos (Cunningham, 2002).

1.3.1. Primers (Iniciadores)

Os primers ou iniciadores são oligonucleotídeos responsáveis por delimitar a área alvo a ser amplificada, sendo utilizados rotineiramente nas operações da PCR. Estes iniciadores são acrescentados à solução e após uma diminuição da temperatura, ocorre hibridizações com as sequências complementares presentes nas moléculas do fragmento alvo de DNA, possibilitando a identificação específica de determinados microrganismos patogênicos ou não.

Os fragmentos de DNA a serem amplificados na PCR não devem exceder 3000 pares de bases (bp) e idealmente serem inferiores a 1000 bp. Para o presente estudo visou-se fragmentos de 300 a 400 bp. Por sua vez, a correta dimensão dos primers é também fundamental para o correto funcionamento do experimento. Sendo assim, os primers devem apresentar tamanho suficiente para que a probabilidade de ocorrer a hibridização com fragmentos não desejados sejam reduzidas (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Uma das questões importantes referentes a primers é a sua concentração presente na solução, podendo afetar o resultado final da PCR. Isto é, estando presente uma baixa concentração dos iniciadores, ocorre uma má hibridização, por outro lado, concentrações excessivas induzem a sintetização de produtos indesejados (inespecíficos), além da formação de dímeros de primers (Chen & Janes, 2002; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008), afectando os produtos da PCR.

1.3.2.Desenhos de primers

A bioinformática é uma área científica interdisciplinar que usa a tecnologia para fins de organização e análise de dados biológicos, com o intuito de solucionar assuntos complexos e de grande importância (Singh & Kumar, 2001).

Dentre as contribuições desta área multidisciplinar da ciência, encontra-se a possibilidade do desenho de primers (iniciadores), técnica desenvolvida pouco tempo após o desenvolvimento da técnica de PCR (Rychlik & Rhoads, 1989). Hoje o uso desta ferramenta é uma das técnicas mais utilizadas em processos envolvendo a Polymerase Chain Reaction (PCR), sendo um processo chave para a amplificação bem sucedida da sequência genética analisada. Pode-se citar os seguintes exemplos de softwares usados atualmente para o desenho de primers, são eles: Oligo (Rychlik & Rhoads, 1989), Wisconsin GCG, Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000), Primo (Li *et al.*, 1997), Pride (Haas *et al.*, 1998), Primerfinder ([http:// arep.med.harvard.edu / PrimerFinder / PrimerFinderOverview.html](http://arep.med.harvard.edu/PrimerFinder/PrimerFinderOverview.html)), OSP (Hillier & Green, 1991), Primermaster (Proutski & Holmes, 1996), Hybsimulator (Hyndman *et al.*, 1996), e PrimerPremiere.

Muitos destes programas acima citados, fornecem previsões de primers de maneira automática quando fornecida uma sequência de material genómico (Li *et al.*, 1997; Haas *et al.*, 1998). Estes programas possuem variáveis entre si como sua facilidade de manuseio e eficiência computacional logarítmica, o que acaba por resultar em diferentes qualidades de projectos envolvendo a técnica de PCR (Yuryev, 2007).

Esses iniciadores merecem uma atenção especial quanto a seus parâmetros específicos do momento em que são “sintetizados”, tais como: temperatura, tamanho, composição e conteúdo GC. Esses essenciais parâmetros são calculados através da utilização destes softwares específicos, o que denota a necessidade de desenvolvimento e uso crescente de métodos computadorizados vinculados à biologia molecular. Durante os procedimentos de emparelhamento há necessidade de otimizações e análises criteriosas do procedimento, pois o primer desenhado pode potencialmente, emparelhar com localidades indesejadas do fragmento genômico analisado, gerando falsos positivos (Yuryev, 2007).

O desenvolvimento de primers possui diferentes fases de processamento em sua síntese. Estas fases envolvem a busca e seleção do gene alvo, escolha das sequências que contém os genes alvo, alinhamento das sequências, bem como a escolha criteriosa dos primers sintetizados e sua validação através de testes como o BLAST (Garces & Lima, 2004). Estes parâmetros físicos de cada um dos primers escolhidos para a utilização em trabalhos devem ser semelhantes, assegurando assim o bom funcionamento e desempenho entre os mesmos.

As características desejáveis que devem ser apresentadas nos primers sintetizados são (Judelson, 2006):

- Temperatura de emparelhamento (T_m) na faixa de 52 a 62°C;
- Ausência da capacidade de dimerização;
- Ausência significativa da formação de grampos (Hairpin, > 3bp);
- Inexistência de locais secundários de emparelhamento dos primers;
- Baixa especificidade na ligação na extremidade 3' (“Three pair end”);
- Comprimento dos primers entre 20 e 25 bases.

2. Material e Métodos

2.1. Experiências laboratoriais informáticas

2.1.1. Gene *ToxR*

No presente estudo foram analisados diversos genes alvo que poderiam ser os ideais para a identificação de duas subespécies da bactéria patogênica *Photobacterium*. Estas subespécies foram seleccionadas devido as grandes perdas econômicas e danos aos cultivos ao redor do globo, sendo os agentes causativos de duas das principais doenças em aquacultura, a *Vibriose* e a *Photobacteriose*. Dentre estes genes analisados e também presentes no genoma das subespécies, o que se mostrou mais “apropriado” a procedência dos sequenciais estudos foi o gene denominado por *ToxR*, relacionado a capacidade toxicológica transmembranar das bactérias. Este gene foi escolhido devido à existência de seu estudo na literatura científica para as duas subespécies de *Photobacterium* a serem analisadas.

Para o encontro e confirmação da existência deste gene na literatura, foi elaborada uma pesquisa no site da NCBI, utilizando o banco de dados de nucleotídeos. Esta pesquisa mostrou a existência de tal gene nas sequências genômicas das duas subespécies e em outras diversas estirpes bacterianas. Devido a presença de tal gene em outras sequências genômicas bacterianas, foram tomadas precauções para evitar interferências nos processos de amplificação laboratoriais. Ou seja, foi elaborado um banco de dados com as sequências das bactérias que continham o gene *ToxR*.

Essas sequências selecionadas para a elaboração de um banco de dados, computaram um número total de 77 sequências genéticas variadas com a presença do gene *ToxR*. Destas 77 sequências, 21 são das subespécies de *Photobacterium*, onde 16 sequências pertencem a subespécie *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* e 5 sequências pertencentes às estirpes da subespécie *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Posteriormente à obtenção das sequências a cima citadas, foi realizado o alinhamento entre as sequências bacterianas adquiridas através dos softwares MEGA.

2.1.2. Softwares e validação dos primers

As sequências foram alinhadas no software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) através da função *ClustalW*, proporcionando um adequado alinhamento para a continuidade dos procedimentos de desenho. Posterior a este alinhamento, todas as sequências foram adicionadas à ferramenta Primer-Blast, um outro software vinculado gratuitamente ao site NCBI que indica através das sequências inseridas e da configuração de parâmetros disponíveis em seu portfólio de acordo com as especificidades para tal síntese, os melhores primers para a amplificação das áreas desejadas. Para o presente caso foram escolhidos parâmetros para síntese de primers que amplificassem uma região de até 400 pares de bases (bp), tamanho suficiente para que não haja problemas de hibridização indesejada segundo a literatura. Após a inclusão dos parâmetros desejados no software já citado, os resultados que este nos fornece são relacionados aos parâmetros ideais já referidos para o seu perfeito desempenho.

Os primers sintetizados com o auxílio dos programas já citados, passaram por uma validação no site da NCBI, através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) com a função selecionada nucleotide blast, que demonstram a identificação entre os primers e as bactérias, onde os parâmetros necessários para confirmação de sua funcionalidade, Query Coverage e Max Indent, devem apresentar valores próximos a 100%, o que reporta uma boa sensibilidade e especificidade de cada um dos primers, evitando hibridizações indesejadas.

2.1.3. Primers sintetizados escolhidos

Depois de completas as exigências de verificação e de validação através dos softwares já citados e posteriormente estabelecido o carácter de especificidade dos primers, foram seleccionados 2 conjuntos de primers,

contendo 2 primers forward e 2 primers reverse, que foram utilizados nos procedimentos laboratoriais empíricos no decorrer do estudo.

O primeiro par de primers designado por ToxRn1-F (F=forward) e ToxRn1-R (R=reverse) foi seleccionado para exercer a função de amplificação de um primeiro procedimento de PCR. O primer forward ToxRn1-F foi alterado devido a uma única degeneração encontrada quando do seu alinhamento com as sequências genómicas bacterianas das duas subespécies seleccionadas. Essa degeneração ocorreu no oitavo nucleosídeo, sendo a diferença nesta posição em relação as sequências bacterianas a presença de adenina e guanina, respectivamente para *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. A literatura indica que em casos de divergência para adenina (A) e guanina (G), a letra código correspondente a degeneração a ser incluída é a R. Degenerações diminuem a especificidade dos primers. Porém, por termos realizado dois procedimentos de PCR esta única degeneração, não veio a comprometer a fiabilidade do primer desenvolvido ou do produto da PCR. O ToxRn1-F apresenta a seguinte sequência de bases 5'-GGC TAT TRC AGC AAC GGA ACA CG-3', com um comprimento de 23 bases, conteúdo de GC de 54,3%, temperatura de emparelhamento (T_m) de 58,3 °C a 61,1 °C estando dentro dos padrões já citados. Para o primer reverse ToxRn1-R, foram constatadas duas degenerações na sexta e décima segunda base quando do seu alinhamento com as sequências das subespécies já citadas, substituindo respectivamente uma adenina (A) e uma timina (T), pelas letras código R e Y, possuindo a seguinte sequência de bases 5'- TTT GGY GTT ACR ACT TGC ACC CCT-3', com um comprimento de 24 bases, conteúdo GC de 45,8% e temperatura de emparelhamento T_m de 59,3 °C.

O segundo par de primers sintetizados para o outro procedimento de PCR foram denominados por ToxRn2-GC-F (F=forward e GC=GC Clamp) e ToxRn2-R (R=reverse). O primer forward ToxRn2-GC-F não apresentou degenerações. Porém, foi alterado, havendo a inserção de um GC Clamp em sua sequência de bases. O GC Clamp caracteriza-se por aumentar a especificidade de ligação dos primers na extremidade 3' devido as forte ligações de bases G e C presentes.

Portanto, sua sequência passou de 5'- CA GCA ACG GAA CAC GCA GAA GA-3' com 22 bases de comprimento para a sequência 5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCA GCA ACG GAA CAC GCA GAA GA-3' com o GC Clamp possuindo 62 bases de comprimento, com conteúdo GC de 54,5% e temperatura de emparelhamento T_m de 60,1 °C. Já o primer reverse ToxRn2-R não sofreu alterações em sua constituição desde seu alinhamento com as sequências das subespécies estudadas, permanecendo com a sequência 5'- TGC ACC CCT TTA ACC GAA AAG AGT G-3', possuindo 25 bases de comprimento, conteúdo de GC igual a 48% e temperatura de emparelhamento igual a 59,5 °C. O "GC Clamp" incluído na sequência do primer ToxRn2-GC-F, realizou-se visando um procedimento futuro de DGGE ("Denaturing gradient gel electrophoresis").

2.2.Experiências laboratoriais empíricas

Após a definição dos primers a cima citados e obtenção dos parâmetros desejados, foi elaborado o pedido de síntese dos mesmos junto a IBA (Solutions for life Science) em Göttingen na Alemanha.

Ao serem recebidos os primers, foram escolhidos os padrões e protocolos moleculares, que foram utilizados durante os processos de amplificação das sequências do material genómico das duas subespécies de *Photobacterium* (*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*). Ambas as linhagens já com DNA isolado de culturas, foram obtidas nos Laboratórios do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

2.2.1.Protocolo de "validação" bacteriana em PCR

Previamente a aplicação dos procedimentos escolhidos para o presente estudo com as 2 subespécies da bactéria *Photobacterium*, foi realizado um PCR para confirmação da funcionalidade dos materiais genómicos das mesmas, fornecidas pelo departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. Neste

procedimento foram calculadas as quantidades de substâncias a serem usadas para 7 reações ou tubos de PCR denominada “MIX”, dos quais dois tubos continham material genómico puro das subespécies, outros dois tubos com material genómico das bactérias diluído 10 vezes, um controle positivo (DNA bacteriano padrão), um controle negativo e uma reacção “reserva”. Os valores para cada substância foram os seguintes:

- 10 μL (Microlitro) de H_2O miliq multiplicado o número de reacções (7) = 70 μL ;
- 2 μL de Acetamida multiplicado o número de reacções (7) = 14 μL ;
- 12,5 μL de MasterMix multiplicado o número de reacções (7) = 87,5 μL ;
- 0,5 μL do primer 1378R multiplicado o número de reacções (7) = 3,5 μL ;
- 0,5 μL do primer 984GCF multiplicado o número de reacções (7) = 3,5 μL ;
- 1 μL de DNA para cada tubo das subespécies estudadas;

Após este preparo foram colocados em cada tubo 25 μL desta mistura, onde 24 μL eram da substância “MIX” somada a 1 μL de DNA.

Prontas estas misturas e o material analisado devidamente distribuído em cada tudo, e estes tubos de reacção foram submetidos a um programa de PCR padrão como mostrado na tabela 3, a seguir:

Tabela 3. Programa de PCR para confirmação da funcionalidade do material genómico das bactérias analisadas.

Programa PCR	
35 ciclos	94°C – 4 minutos
	95°C – 1 minuto
	53°C – 1 minuto
	72°C – 1 minuto e 30 segundos
	72°C – 10 minutos

Finalizados estes procedimentos de PCR, o material resultante da confirmação de funcionalidade do material genómico passou pelos mesmos procedimentos de visualização e análise de resultados que serão abordados adiante.

2.2.2.Procedimentos e protocolo de PCR

Foram realizados cinco procedimentos de PCR envolvendo as bactérias estudadas visando a amplificação de material genómico (*ToxR*).

Para o primeiro procedimento optou-se por realizar uma primeira utilização direta dos dois sets de primers, visando a confirmação de seus respectivos funcionamentos. Neste procedimento, foram usados o DNA diluído em 10 vezes das bactérias *Photobacterium damsela* subespécie *damsela* e *Photobacterium damsela* subespécie *piscicida*, sendo as substâncias calculadas e utilizadas em cada tubo, solução denominada “MIX”, para o tal procedimento podendo ser observadas em conjunto com o programa do termociclador a que foram submetidas as amostras na tabela 4. Neste procedimento ainda pode-se observar a presença de acetamida, que tem a finalidade de diminuir a temperatura de emparelhamento dos primers com as sequências genómicas e diminuir a probabilidade de ocorrência de dimerização.

Tabela 4. Substâncias utilizadas no PCR para cada uma das bactérias e o programa do termociclador a que foram submetidas.

PCR – 1º par de Primers	PCR – 2º par de Primers
140,00 µL de H ₂ O miliq	119,00 µL de H ₂ O miliq
14,00 µL de BSA	28,00 µL de Acetamida
175,00 µL de MasterMix	175,00 µL de MasterMix
3,5 µL do primer ToxRn1-F	7 µL do primer ToxRn2-GC-F
3,5 µL do primer ToxRn1-R	7 µL do primer ToxRn2-R
1 µL de <u>DNA</u> para cada tubo das subespécies estudadas;	

Programa 1º e 2º PCR	
35 ciclos	95°C – 10 minutos
	94°C – 1 minuto
	52, 53, 58, 59, 60 e 61°C – 1 minuto
	72°C – 1 minuto
	72°C – 7 minutos
35 ciclos	

Já para o segundo procedimento de PCR, optou-se por utilizar o DNA das bactérias estudadas sem que fosse realizado o processo de diluição. Neste procedimento optou-se por apenas usar a substância BSA (Bovine serum albumine - Sigma), visando mais uma vez a obtenção do melhor Mix de substâncias para uma amplificação visível dos fragmentos genómicos Também foram alteradas as temperaturas para uma possível melhora da hibridação dos primers com as sequências genómicas bacterianas. As substâncias calculadas e utilizadas em cada tubo para o tal procedimento podem ser observadas na tabela 5, em conjunto com o programa do termociclador a que foram submetidas as amostras.

Tabela 5. Substâncias utilizadas no PCR para cada uma das bactérias e o programa do termociclador a que foi submetido o DNA puro das duas bactérias analisadas.

PCR – 3º procedimento	
140,00 µL de H ₂ O miliq	
20,00 µL de DMSO	
200,00 µL de MasterMix	
8 µL do primer ToxRn1-F	
8 µL do primer ToxRn1-R	
1 µL de bactéria por tubo	

Programa – 3º procedimento	
95°C – 10 minutos	
35 ciclos	94°C – 1 minuto
	54, 55, 56, 57, 58 e 59°C – 1 minuto
	72°C – 1 minuto
	72°C – 7 minutos
35 ciclos	

Já o quarto e o quinto procedimento as temperaturas e as substâncias foram as mesmas, alterando apenas o conteúdo genómico a ser analisado em cada processo. Para o caso do quarto procedimento o material genómico utilizado foram células lisadas a 100°C de ambas as bactérias, visando a amplificação direta de seu DNA, e também foi utilizado no mesmo procedimento o DNA diluído da subespécie *piscicida*. Para o quinto e último procedimento de PCR foram utilizadas as células lisadas e o DNA puro apenas da subespécie *damselae*. Porém para este último procedimento testou-se uma alternativa, visando uma possível amplificação com a combinação de primers dos 2 sets de primers escolhidos, no caso a combinação ocorreu entre o primer Forward (ToxRn1-F) do primeiro par de primers e o primer Reverse (ToxRn2-R) do segundo par de primers (Tabela 6).

Tabela 6. Substâncias utilizadas no PCR para o 4º e 5º procedimentos e o programa do termociclador a que foram submetidos.

PCR – 4º procedimento		PCR – 5º procedimento	
240,00 µL de H ₂ O miliq		160,00 µL de H ₂ O miliq	
30,00 µL de DMSO		20,00 µL de DMSO	
300,00 µL de MasterMix		200,00 µL de MasterMix	
12 µL do primer ToxRn1-F		8 µL do primer ToxRn1-F	
12 µL do primer ToxRn1-R		8 µL do primer ToxRn2-R	
1 µL de bactéria por tubo		1 µL de bactéria por tubo	

Programa – utilizado para o 4º e 5º procedimento	
35 ciclos	95°C – 10 minutos
	94°C – 1 minuto
	58, 59, 60, 61, 62 e 63°C – 1 minuto
	72°C – 1 minuto
	72°C – 7 minutos

Vale aqui ressaltar que foram inseridos dois (2) tubos de reação contendo solução negativa (água + reagentes) para controle de contaminação em cada procedimento. No total cada tubo de reação de PCR a cima descrito continha 25 µL de toda esta mistura, sendo 24 µL do “MIX” de substâncias elaborado somado a 1 µL do DNA.

Após o término dos cálculos dos conteúdos a serem colocados nos tubos de reação de PCR com os respectivos DNA's e sua devida distribuição (Figura 9), os ciclos e programas a cima descritos ocorreram no termociclador da marca Applied Biosystems, modelo Veriti (96 Well Thermal Cycler) (Figura 10), onde o tempo total decorrido do procedimento para a amplificação foi de aproximadamente duas horas. Posteriormente ao término dos ciclos realizados no termociclador para cada procedimento a cima descrito, as suas respectivas amostras passaram por electroforese em gel, onde foi possível a visualização do produto da PCR.

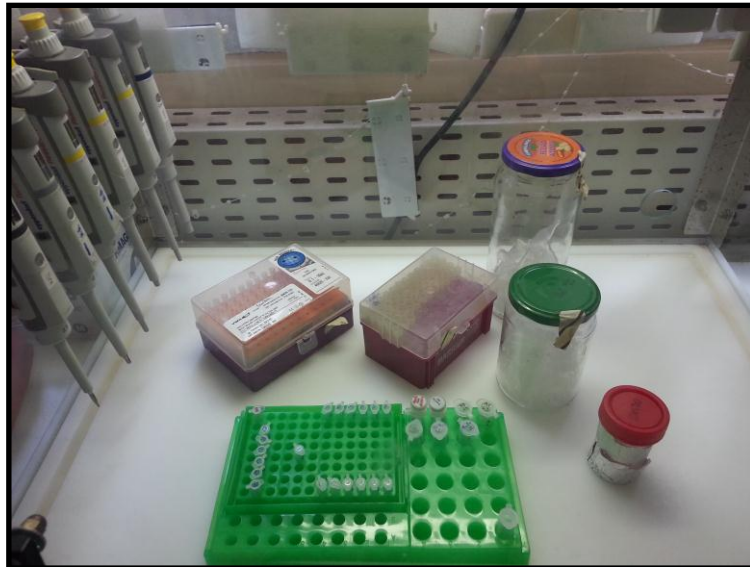


Figura 9. Distribuição das devidas quantidades de “MIX” e de DNA por tubos de reacção de PCR com o auxílio de micropipetas, dentro da AURA PCR.

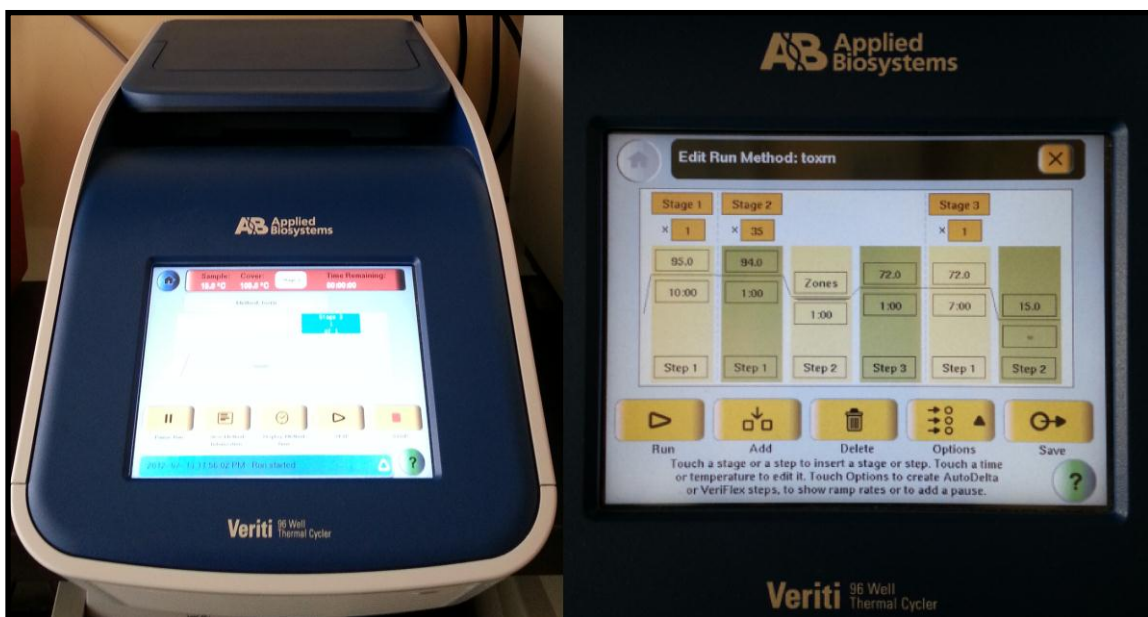


Figura 10. Termociclador utilizado para os procedimentos de PCR, marca Applied Biosystems, modelo Veriti (96 Well Thermal Cycler).

Posteriormente ao término dos ciclos no termociclador foi dada sequência para a observação do material amplificado na reacção. Esta verificação, é elaborada através da utilização da electroforese em gel. Neste procedimento foi elaborado uma superfície em gel de agarose que contém poços elaborados com o

auxílio de “pentas” específicos. Para a confecção deste gel foram utilizados os seguintes elementos:

- 1,2 g de agarose somados a;
- 120 mL da substância TAE (0.04M Tris-Acetato - Fluka, 0.001M EDTA - Fluka, pH 8.0);
- 6 μ L de gel RED;

Estas duas primeiras substâncias foram misturadas e levadas ao microondas durante um minuto para a homogeneização, posteriormente sendo adicionado o gel RED. Verificada a correta mistura da substância, foi necessário esperar que se arrefecesse, para posteriormente ser colocada em uma superfície plana com os “pentas” já citados para a elaboração dos poços, aguardando a completa polimerização (Figura 11).

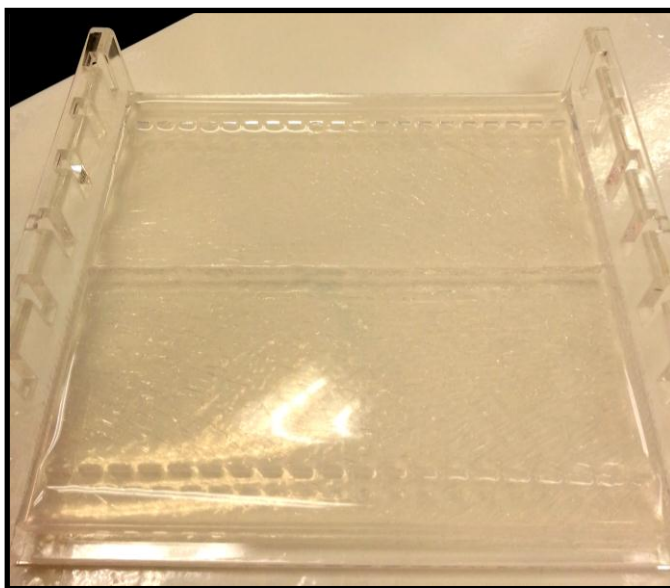


Figura 11. Gel e poços elaborados para a realização da electroforese em gel.

Estando pronto o gel, o mesmo foi levado ao equipamento de electroforese da marca CBS scientific, modelo EPS 300 IIV (Figura 12). Esta

técnica realiza a migração das substâncias adicionadas aos poços nas quantidades a seguir mencionadas:

- 1,5 μL de tampão de carga, somado a;
- 5 μL da amostra da PCR;
- 1,5 μL de marcador (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, MBI Fermentas) no primeiro poço do gel.

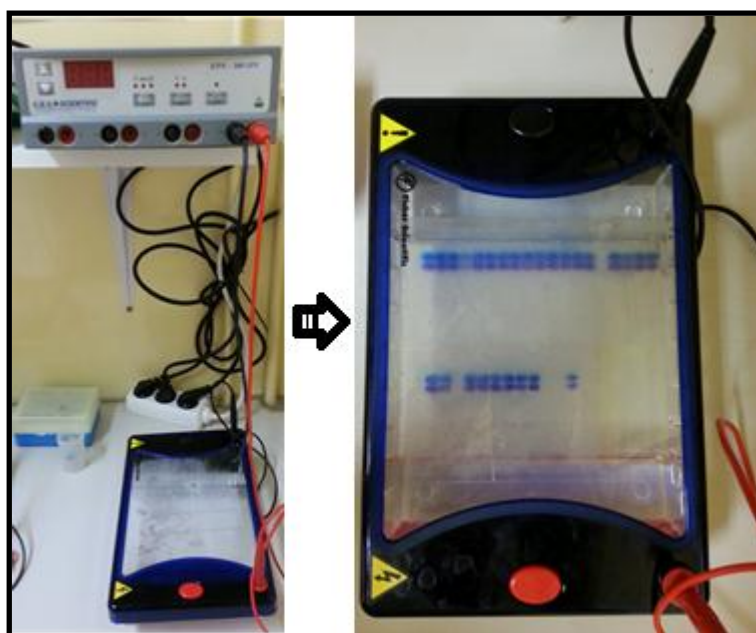


Figura 12. Fonte de estímulos elétricos utilizada para os procedimentos de Electroforese em Gel, marca CBS scientific, modelo EPS 300 IIV.

Estas substâncias realizam as denominadas “corridas” através do estímulo eléctrico, 100 volts durante um período de 30 minutos. Os resultados desta “corrida” são comparadas à substância denominada por marcador (1 kb plus), que é utilizado para determinar o comprimento do fragmento de genómico bacteriano amplificado.

Dado o término dos processos da electroforese em gel, os resultados foram levados a um equipamento para o estímulo por radiação ultravioleta para que o marcador fluorescente detalhe a “corrida” dos compostos. Este

equipamento é pertencente a marca BIORAD e seu modelo é o ChemiDoc™ XRS+ System Image Lab™ (Figura 13).



Figura 13. Equipamentos de visualização dos resultados da Electroforese, ChemiDoc™ XRS+ System Image Lab™ da marca BIORAD.

3.Resultados

3.1.Vertente bioinformática

Os primers elaborados e já citados a cima, apresentaram características ideais comparadas as aconselhadas pela literatura, dentre as quais a temperatura de emparelhamento e seu comprimento de bases, 56°C a 63°C e de 20 a 25 bases de comprimento (Figura 14). Em relação aos resultados bioinformáticos relacionados aos primers sintetizados para o presente estudo (ToxRn1-F, ToxRn1-R, ToxRn2-GC-F e ToxRn2-R), foram designados “específicos” devido aos valores reportados durante as validações elaboradas no programa BLAST da NCBI, onde apresentaram valores de especificidade para Query coverage e Max identity de 92 a 100%. Fatores que mensuram a especificidade em relação ao seu alinhamento com a sequência genómica analisada.

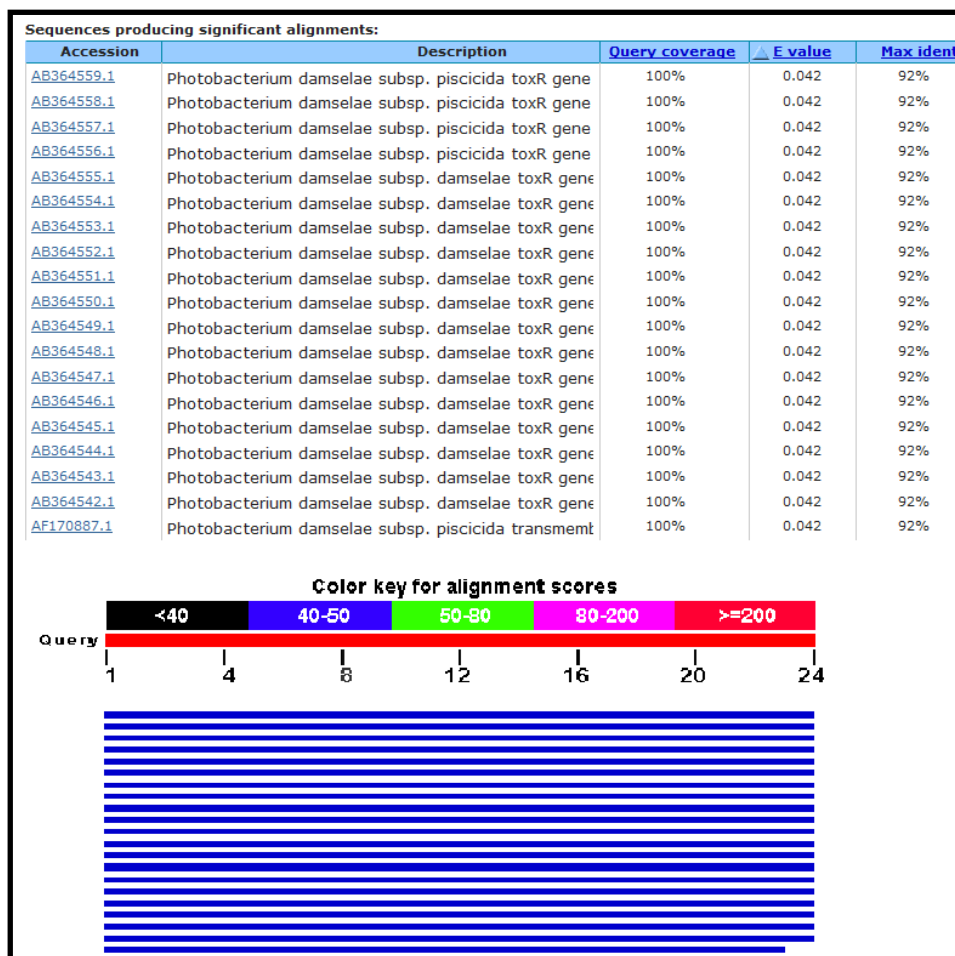


Figura 14. Validação e pontuação de alinhamento com as sequências analisadas das subespécies de *Photobacterium*.

3.2. Vertente laboratorial

3.3. Detecção das duas subespécies bacterianas

Como já informado a cima, foi realizado um procedimento de PCR visando a confirmação da presença de DNA bacteriano alvo através de uma verificação de presença de DNA bacteriano, o 16S. O resultado do produto deste PCR, adicionado a Electroforese Gel e visualizado através do equipamento ChemiDoc™ XRS+ System Image Lab™ da marca BIORAD através de radiação ultra-violeta (UV), mostrou-se positivo para a presença das duas subespécies de

bactérias como podemos observar na figura 15, amplificando fragmentos de 300 pares de bases.

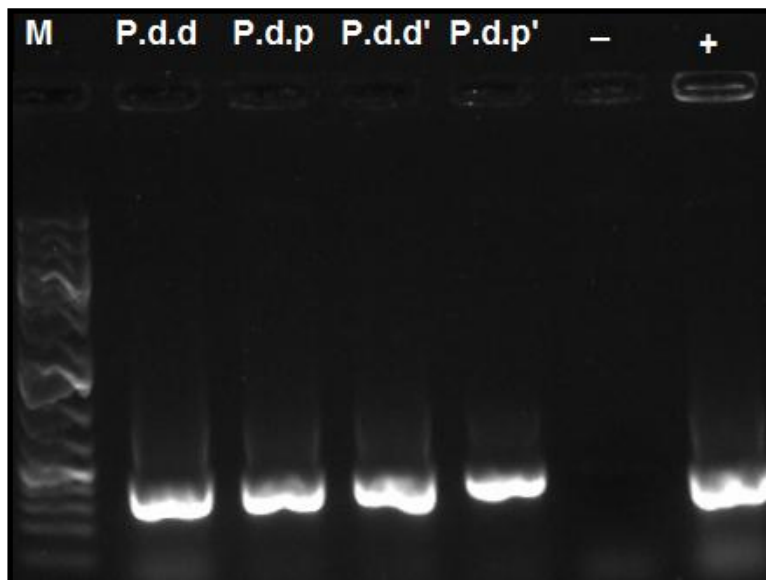


Figura 15. Amplificação positiva para as subespécies da bactéria *Photobacterium*. Legenda: M - marcador, P.d.d – *Photobacterium damsela* subsp *damsela*, P.d.p – *Photobacterium damseale* subsp *piscicida*, P.d.d' – P.d.d diluída 10 vezes, P.d.p' – P.d.p diluída 10 vezes, (-) – negativo e (+) – positivo.

Como pode-se observar na figura exterior, houve amplificação das subespécies estudadas através dos primers universais 984GCF e 1378R, e também do controle positivo de DNA bacteriano. Com isto, foi possível dar continuidade aos procedimentos propostos para o teste de amplificação dos fragmentos genómicos.

3.4.Procedimentos de PCR

Para o primeiro procedimento proposto, utilizou-se como dito a cima, os dois pares de primers de forma direta, ou seja, a utilização do segundo par de primers não foi realizado sobre uma amplificação de um primeiro procedimento de PCR. Seguidas as aplicações e a ocorrência das devidas reacções para o 1º e o 2º PCR, ao serem observados os resultados da amplificação do material, o resultado não foi o esperado, não ocorrendo a amplificação, como pode-se observar na figura 16.



Figura 16. 1º e 2º PCR, a cima e a baixo respectivamente, utilizando os dois pares de primers. Legenda: M – marcador, P – subespécie piscicida, D – subespécie damselae, (52, 53, 58, 59, 60, 61) – temperaturas (°C).

O mesmo resultado, no entanto, também foi observado para os outros procedimentos restantes propostos a cima. Mesmo alterando algumas substâncias e parâmetros como a acetamida, DMSO e BSA, a temperatura, e

uma combinação entre os primers do primeiro e segundo par primers, não promoveram resultados positivos para a amplificação, sendo apenas reportado nas imagens na porção mais inferior, sinais que possivelmente são dos primers que não emparelharam com a sequência alvo. Os resultados dos outros procedimentos podem ser vistos nas figuras 17, 18, 19, 20 abaixo.

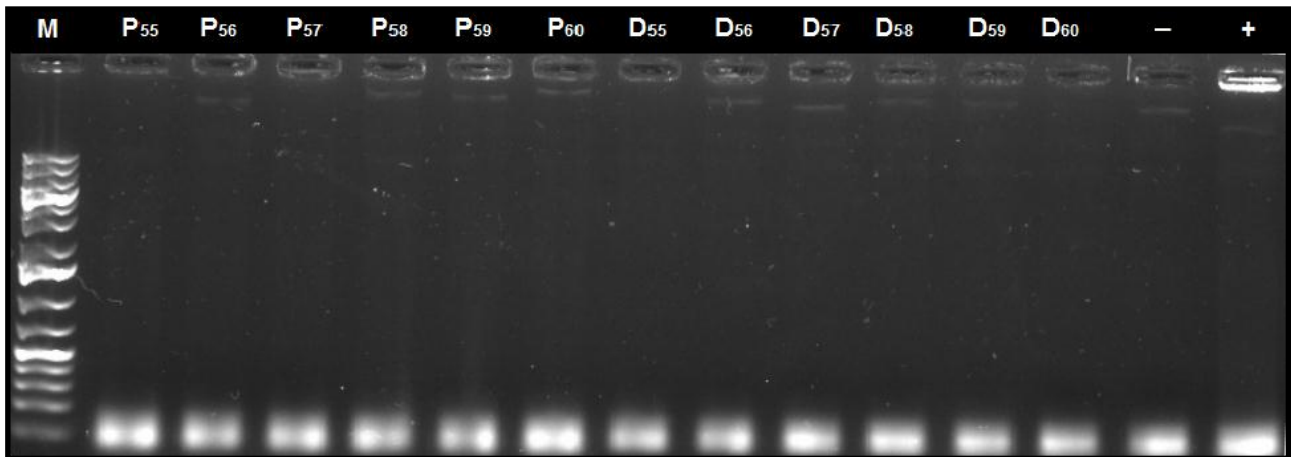


Figura 17. Segundo procedimento de PCR com DNA puro das duas subespécies bacterianas estudadas. Legenda: M – marcador, P – *piscicida*, D – *damselae*, (55, 56, 57, 58, 59, 60) – temperaturas (°C).

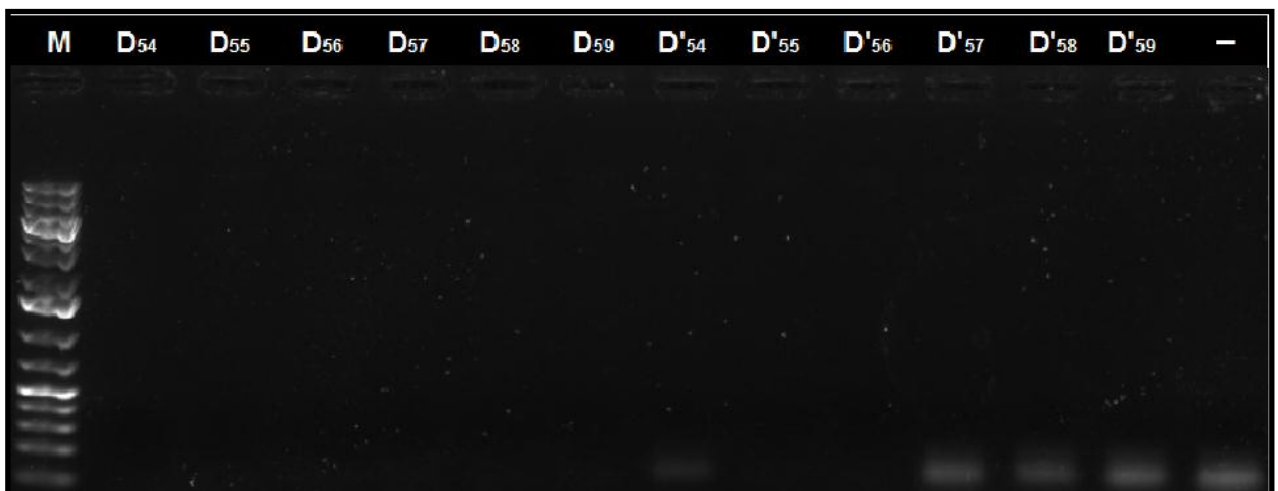


Figura 18. Terceiro procedimento de PCR utilizando DNA puro e DNA diluído da subespécie *damselae*. Legenda: M – marcador, D – DNA puro *damselae*, D' – DNA diluído 10 vezes, (54, 55, 56, 57, 58, 59) – temperaturas (°C).

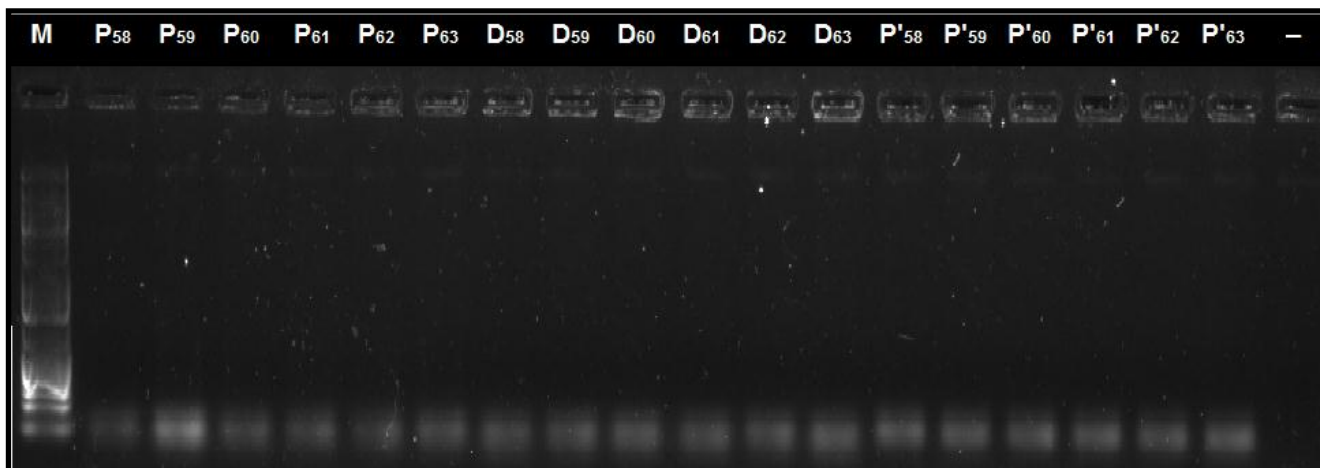


Figura 19. Quarto procedimento de PCR, utilizando células lisadas a 100°C das duas subespécies e a utilização do DNA diluído da subespécie *piscicida*. Legenda: M – marcador, P – células lisadas da subespécie *piscicida*, D – células lisadas da subespécie *damselae*, P' – DNA diluído subespécie *piscicida*, (58, 59, 60, 61, 62, 63) – temperaturas (°C).

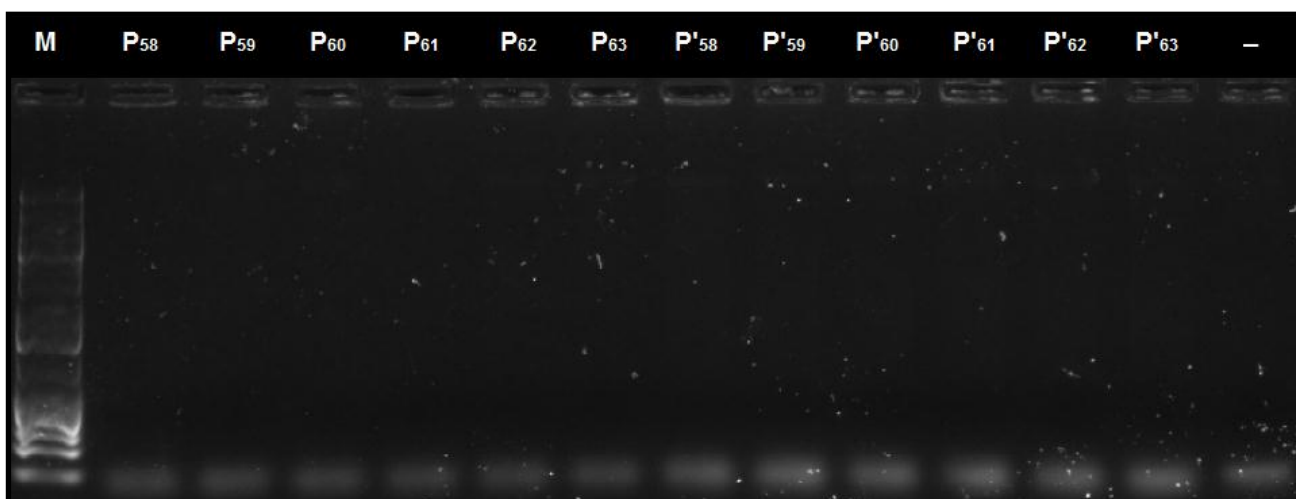


Figura 20. Quinto procedimento de PCR, utilizando as células lisadas a 100°C e o DNA puro apenas da subespécie *damselae*. Legenda: M- marcador, P – células lisadas, P' – DNA puro de *damselae*, (58, 59, 60, 61, 62, 63) – temperaturas (°C).

4. Discussão

A fim de prever ou detectar a presença de agentes bacterianos patogénicos associados a sistemas de aquacultura, pode-se dizer que este estudo é o primeiro, ou um dos primeiros estudos realizados com o intuito de propor e elaborar novos conjuntos de primers moleculares específicos para duas subespécies da bactéria *Photobacterium*, visando a sua utilização para detecção destes patógenos bacterianos na aquacultura através de métodos moleculares por um aluno da Universidade de Aveiro. Apesar dos resultados negativos já fixados neste trabalho mesmo apesar da alternância de condições (temperatura) e de substâncias durante os procedimentos. Deve-se ainda realizar um exaustivo esforço de pesquisa para que se possa saber o por que da não amplificação dos materiais genómicos das amostras analisadas, visto que os sets de primers propostos para o presente estudo mostraram ter alcançado grande desenvoltura nos testes bioinformáticos já reportados.

Osorio *et al.*, (1999), Dalla Valle *et al.*, (2002), também realizaram o procedimento de desenho de primers baseados em sequências genómicas das bactérias. Os primeiros autores basearam-se nas sequências genómicas de *Escherichia coli* e obtiveram sucesso, amplificando fragmentos das estirpes bacterianas *Photobacterium damsela* subespécie *damsela* e subespécie *piscicida*. Pode-se dizer que uma das partes cruciais para o concomitante sucesso de sua pesquisa foi a elaboração de culturas das bactérias acima citadas, posteriormente realizando o isolamento de seu material genómico e seu sequenciamento também realizados por Dalla Valle *et al.*, 2002, procedimentos estes que não foram realizados no presente estudo e que podem ter alterado os resultados finais perante os primers específicos propostos e aplicados. Este mesmo autor ainda realizou o procedimento de alternância de 3 temperaturas, buscando a melhor temperatura de emparelhamento entre os primers propostos por ele (Car 1 e Car 2), procedimento este que também foi realizado no presente estudo, porém visou-se a melhor amplificação com testes envolvendo sempre 6 temperaturas, porém com resultados negativos.

No presente estudo, um total de 5 procedimentos de PCR foram propostos para as amostras de DNA bacteriano com o objectivo de realizar uma melhor amplificação do gene *ToxR*, escolhido para a análise. Apesar da negatividade dos resultados, ainda não se pode dizer que as sequências genómicas das duas bactérias analisadas são incompatíveis aos primers propostos e denominados por ToxRn1-F, ToxRn1-R, ToxRn2-GC-F e ToxRn2-R, pois sua eficiência e especificidade como a cima citada foram consideráveis durante os procedimentos bioinformáticos. Isto leva a crer em algumas possibilidades quanto a negatividade dos resultados. Uma das possibilidades deve-se a presença ou não do material genómico correto de *Photobacterium damsela* subespécie *damsela* e *Photobacterium damsela* subespécie *piscicida*, bem como a degradação ou a contaminação do material genómico e a presença de inibidores no DNA utilizado no estudo. Em alguns estudos, a verificação da pureza elaborada através da espectrofotometria, podem ser um outro motivo para o sucesso da aplicação de primers de carácter específico, não havendo inibidores de amplificação (Osorio *et al.*, 1999). No momento da realização de um protocolo molecular envolvendo as técnicas de PCR, os inibidores já citados, podem ou não serem extraídos com as técnicas de purificação empregadas durante o procedimento (Steffan *et al.*, 1988; Tsai e Olson, 1992; Wilson, 1997). Portanto, o seu desempenho quando da utilização de enzimas manipuladas pode em grande escala afetar ou alterar resultados de análises de amostras ambientais. Por isto, a validação e a demonstração de especificidade do método antes de seu emprego é essencial. A outra possibilidade ainda não descartada apesar de confirmações que provem o contrário, da má elaboração e aplicação dos dados de pesquisa na síntese de novos primers específicos para as duas subespécies já citadas.

Para o caso de uma possível continuação do presente estudo ou proposta de um novo trabalho com as mesmas directrizes, o ideal seria a visita a sistemas de aquacultura, amostragem de animais infectados ou a amostragem da água de sistemas de aquacultura já com a presença de infecção de carácter bacteriano e elaborar os passos de sucesso efectuados por Osorio *et al.*, (1999), com a finalidade de obter e manipular de forma correta todos os dados plausíveis para

uma boa proposta de primers específicos para detecção de patógenos bacterianos.

É ainda importante ressaltar que a biologia molecular na detecção de patógenos apesar de importante, ainda necessita ser aprimorada, pois por exemplo, ainda não se sabe distinguir durante o processamento de análise laboratorial de uma amostra ambiental, como as provindas de sistemas de aquacultura se a procedência dos materiais genómicos estão relacionados a agentes patogénicos virulentos capazes de desencadear um surto infeccioso ou se somente são parte da bacteriofauna natural dos sistemas aquáticos analisados. A importância da compreensão das lacunas moleculares, Dalla Valle *et al.*, (2002), afirmam que os métodos bacteriológicos clássicos para o diagnóstico da Photobacteriose ainda baseiam-se no isolamento do seu agente causador (*Photobacterium damsela subespécie piscicida*) em meio selectivo, seguido pela sua identificação através de testes bioquímicos, técnicas estas que acarretam trabalho exaustivo, não sendo rápidos e sensíveis o suficiente como as técnicas moleculares para prever surtos e doenças. Porém ainda também ressalta que as técnicas moleculares precisam ser melhor compreendidas e desenvolvidas para os fins já citados como diagnósticos de previsão.

5. Conclusão

Considerando o que foi visto e analisado no presente estudo podemos concluir que:

Que os resultados negativos apresentados durante a aplicação dos métodos e procedimentos de pesquisa, precisam ser melhor analisados quanto a suas vertentes laboratoriais, como o prévio cultivo das bactérias ou sua aquisição através de amostras de material contaminado, purificação do conteúdo analisado e isolamento do DNA bem como a sua sequenciação genómica.

O desenho de primers é uma ferramenta molecular importante e que deve ser utilizada mais frequentemente, com a finalidade de sensibilizar os métodos de

detecção. Sendo assim, outros estudos a cerca dos primers propostos e denominados por ToxRn1-F, ToxRn1-R, ToxRn2-GC-F e ToxRn2-R, devem ser realizados com a finalidade de fazer valer a sua especificidade como reportada nos métodos bioinformáticos do presente estudo, a fim de sugerir uma nova ferramenta para identificação de estirpes bacterianas das duas subespécies de *Photobacterium* em sistemas de aquacultura. E também realizar o teste dos primers aqui elaborados com outras espécies de bactérias como controle, visando a confirmação de sua especificidade, já que este gene alvo (*ToxR*), esta presente em outras sequências bacterianas.

A pesquisa molecular é um importante pilar e está se tornando rapidamente uma vertente integral para a compreensão dos factores de interactividade entre o ecossistema aquático, os agentes patogénicos bacterianos e o animal aquático (possível hospedeiro), embora o seu emprego seja limitado e ainda consideravelmente caro em relação aos equipamentos utilizados.

Em termos gerais, os diagnósticos baseados em técnicas moleculares, principalmente os baseados em PCR são em grande parte eficientes e sensíveis a cerca da especificidade na detecção de agentes causadores de doenças na aquacultura. E portanto, seu uso deve realizar a convergência de metodologias tornando mais fáceis os diagnósticos de doenças, bem como no auxílio a elaboração de equipamentos de detecção (kits de reagentes comerciais), auxiliando no bom manejo das culturas.

Por fim, os métodos moleculares de detecção de agentes causadores de doenças em aquacultura, devem ser inseridos de forma integral, nas legislações de controlo e sanidade de actividades comerciais envolvendo pescado.

6.Referências

Arrojado, S. G. L. C. (2009). Inactivation of fish pathogenic bacteria by cationic porphyrin. Dissertação de mestrado.

Austin, B.; Austin, D. (2007). Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p.

Almeida, A.; Cunha, A.; Gomes, N.; Alves, E.; Costa, L.; Faustino, M.A.F. (2009). Phage Therapy and Photodynamic Therapy: low Environmental Impact Approaches to Inactivate Microorganisms in Fish Farming Plants. *Mar. Drugs*, 7, 268-313.

American Institute of Biological Sciences (2009, January 2). Aquaculture's Growth Seen As Continuing. *ScienceDaily*. Retrieved May 21, 2012, from <http://www.sciencedaily.com/~ /releases/2009/01/090102082248.htm>

Arthur, J.R., Bondad-Reantaso, M.G., Hewitt, C., Campbell, M.L., Hewitt, C.L., Phillips, M.J. and Subasinghe, R.P. (2009). Understanding and applying risk analysis in aquaculture: a manual for decision-makers. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 519/1. Rome, FAO. 113 pp.

Arias, A.R.L.; Buss, D.F.; Albuquerque, C.; Inácio, A.F.; Freire, M.M.; Egler, M. ; Mugnal, R.; Baptista, D.F. (2007). Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v.12, n.1, p.61-72.

Bonet, R., Magariños, B., Romalde, J. L., Engelhardt-Pujol, M. D., Toranzo, A. E. and Congregado, F. (1994). Capsular polysaccharide expressed by *Pasteurella piscicida* grown in vitro. *FEMS Microbiology Letters*, 124: 285–289. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07298.x

Butler, J.M., Ruitberg, C.M., Vallone, P.M. (2001). *Fresenius J Anal Chem* 369:200–205

Biosca, E.G., Amaro, C, Esteve, C, Alcaide, E. and Garay, E. (1991). First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases* 14, 103-109.

Balebona, M.C., Zorrilla, I., Morinigo, M.A. and Borrego, J.J. (1998). Survey of bacterial pathogens affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture* 166, 19-35.

Castro-Silva, M. A. (2003). Ocorrência e caracterização de *Vibrio vulnificus* isolados de amostras de molusco e água de áreas de cultivo de Santa Catarina. Tese de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Brasil.

Cullimore, Roy D. (2010). *Practical atlas for bacterial identification*, 2ª edição. Editora CRC Press. Regina, Saskatchewan, Canada. 327 p.

Cassell, G.H., Mekalanos, J. (2001). Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. *JAMA*. 285(5):601-605.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Vibrio vulnificus* infections associated with raw oyster consumption— Florida, 1981-1992. *Morb Mortal Wkly*; 42:405-7. Webgrafia: www.cdc.gov.htm. Acessado em 15/05/2012.

Chen, B.-Y., Janes, H.W. (2002). *PCR cloning protocols*. Second Edition. Humana Press 192, 439 pp.

Chammas, M. A. (2007). *Status da Aquicultura no Mundo e no Brasil em Sergipe*. Biblioteca on-line Disponível em: <<http://www.biblioteca.sebrae.com.br>>

Cunningham, C. O. (2002). Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture* 206. 19-55.

Dalla Valle, L., Zanella, L., Belvedere, P., Colombo, L. (2002). Use of random amplification to develop a PCR detection method for the causative agent of fish pasteurellosis, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Vibrionaceae). *Aquaculture*. 207. 187-202.

Dechet, A.M., Koram, N., Jain, S., Painter, J. (2005). Wound infections: an important cause of *Vibrio* morbidity and mortality—United States, 1997-2003. Presented at the Centers for Disease Control and Prevention 54th Epidemic Intelligence Service Conference; Atlanta, Ga.

Defoirdt, T.; Boon, N.; Sorgeloos, P.; Verstraete, W.; Bossier, P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol.* 25, 472-479.

Delgado, I.F., Paumgarten, F.J.R. (2004). Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.20, n.1, p.180-186.

Dias, A. J.; Carmo, A. J.; Polette, M. (2009). As Zonas Costeiras no contexto dos Recursos Marinho. *Revista da Gestão Costeira Integrada.* 9(1):3-5.

De Ley, J.; Mannheim, W.; Mutters, R.; Piechulla, K.; Tytgat, R.; Segers, P.; Bisgaard, M.; Frederiksen, W.; Hinz, K.-H.; AND Vanhoucke, M. (1990). Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the Pasteurellaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 128- 139.

Dutra, B.K.; Fernandes, F. A.; Lauffer, A. L.; Oliveira, G. T. (2009). Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castrovi* (Crustacea, Amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, New York*, v.149, n. 4, p.640-646.

Egusa, S. (1983) Disease problems in Japanese yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, culture: A review. Citado em: Stewart, J.E. (ed.). *Diseases of Commercially Important Marine Fish and Shellfish*. Conseil International pour l'Exploration de la Mer, Copenhagen, pp. 10-18. Citado em: Austin, B.; Austin, D. (2007). *Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish*. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p.

Egidius, E., Andersen, K., Causen, E. and Raa, J. (1981) Cold water vibriosis or "Hitra disease" in Norwegian salmonid farming. *Journal of Fish Diseases* 4, 353-

354. Citado em: Austin, B.; Austin, D.; Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p. 2007.

Egidius, E., Wiik, R., Andersen, K., Hoff, K.A. and Hjeltnes, B. (1986) *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36, 518-520. Citado em: Austin, B.; Austin, D. (2007). Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p.

Ehrlich, H. L. (1997). Microbes and metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 687-692. Citado em: Loguercio, E. E. F. (2005). Determinación de comunidades bacterianas y su influencia sobre los ciclos biogeoquímicos de metales en la laguna CARÉN (SANTIAGO, REGIÓN METROPOLITANA).

Fouz, B.I., Larsen, J.L. and Toranzo, A.E. (1991) *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortalities in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 11, 80-81. *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortalities in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*)

Fouz, B., Larsen, J.L., Nielsen, B., Barja, J.L. and Toranzo, A.E. (1992). Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot, *Scophthalmus maximus* in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 12, 155-166.

FAO (2008). Pesca e Departamento da Aquicultura, O Estado Mundial da Pesca e da Aquicultura - SOFIA. Disponível em :<[http: www.fao.org](http://www.fao.org)>

FAO (2010). The State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries & Aquaculture Department. Rome.

FAO (2006a). FAN, FAO Aquaculture, Newsletter 35. 52pp.

FAO (2006b). FAN, FAO Aquaculture, Newsletter 36. 55pp.

FAO (2002). The State of the world Fisheries and Aquaculture. Roma: Electronic Publishing and Support Branch Communication Division.

FDA. Pesticide residues in food and feed enforcement criteria (CPG 7141.01). Compliance policy guides. Washington, U.S. Government Printing Office. DHHS/PHS/FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition, 1989. Citado em: Masson, M. L. & Pinto, R. A. (1998). Perigos potenciais associados ao consumo de alimentos derivados de peixe cru. B.CEPPA, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 71-84.

FDA. Tolerances for residues of new animal drugs in food, 21 CFR 556.660. Citado em: CODE OF FEDERAL REGULATIONS (CFR). Washington : U.S. Government Printing Office, 1994. Citado em: Masson, M. L. & Pinto, R. A. (1998). Perigos potenciais associados ao consumo de alimentos derivados de peixe cru. B.CEPPA, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 71-84.

Freeman, M. A. (1995). The Benefits of water quality improvements for marine recreation: a review of the empirical evidence. *Marine Resource Economics* 10, 385–406.

Freitas, R.M., (2001). Aquicultura, aspectos sobre a sua produção, planificação e o caso de Cabo Verde. Relatório de Investigação 15, Curso de Biologia Marinha e Pescas, Instituto Superior de Engenharia e Ciências do Mar. 16pp.

Fouz, B., Toranzo, A.E., Milan, M. and Amaro, C. (2000). Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of Applied Microbiology* 88, 531-535.

Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J. L., Gauthier, M. & Christen, R. (1995). Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the re assignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45, 139±144.

Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A., Leong, D. (1994). PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 32(2): 335-351.

Gulland, J.A. (1971). The fish resources of the ocean. West Byfleet, UK, Fishing News (Books) Ltd. Citado em: FAO. (2010). The State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries & Aquaculture Department. Rome.

Hawke, J.P., (1996). Importance of a siderophore in the pathogenesis and virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in hybrid-striped bass (*Morone saxatilis* *Morone chrysops*). Ph.D. Dissertation. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge, LA.

Haas, S., Vingron, M., Poustka, A. & Wiemann, S. (1998). Primer design for large scale sequencing. *Nucleic Acids Res.* 26, 3006–3012.

Harris, M.B., Tomas, W., Mourão, G., Silva, C.J., Guimarães, E., Sonoda, F. and Fachim, E. (2005). Safeguarding the Pantanal Wetlands: threats and conservation initiatives. *Conservation Biology*, vol. 19, no. 3, p. 714-720.

Hanley, N., Bell, D., Alvarez-Farizo, B. (2003). Valuing the benefits of coastal water quality improvements using contingent and real behaviour. *Environmental and Resource Economics* 24, 273–285.

Henriques, M. (1998), —Manual de Aquicultura. Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar (CBAS), Lisboa.

Hoi, L., L. Larsen, Dalsgaard I., Dalsgaard, A. (1998). Occurrence of *Vibrio vulnificus* Biotypes in Danish Marine Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(1): 7-13.

Hoff, K.A. (1989). Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 1775-1786. Citado em: Austin, B.; Austin, D. (2007). *Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish*. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p.

Hilborn, R. (2007). Reinterpreting the state of fisheries and their management. *Ecosystems*, 10(8): 1362–1369.

Hlady, W.G. and Klontz, K.C. (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *The Journal of Infectious Diseases*. 173: 1176-1183.

Hillier, L. & Green, P. (1991). OSP: a computer program for choosing PCR and DNA sequencing primers. *PCR Methods Appl.* 1, 124–128.

Hyndman, D., Cooper, A., Pruzinsky, S., Coad, D. & Mitsuhashi, M. (1996). Software to determine optimal oligonucleotide sequences based on hybridization simulation data. *Biotechniques* 20, 1090–1097.

IPCC. (2007). *Climate Change 2007: synthesis report*. Citado em: Core Writing Team, Pachauri, R.K., Reisinger, A. (Eds.), *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp.

Janssen, W.A. and Surgalla, M.J. (1968) Morphology, physiology and serology of a. *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *Journal of Bacteriology* 96, 1606-1610. Citado em: Austin, B.; Austin, D. (2007). *Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish*. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p.

Jobling, M. (1994). *Fish bioenergetics*. London: Chapman & Hall. 294p.

Judelson, H.(2006). Guidelines for designing primers. *Primer guidelines*. 10.06. 6p

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27(2-3): 95-125

Kimpton, C.P., Fisher, D., Watson, S., Adams, M., Urquhart, A., Lygo, J., Gill, P. (1994). *Int J. Legal Med* 106:302–311. Citado em: Schoske, R., Vallone, P.M., Ruitberg, C. M., Butler, J. M. (2003). Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10y chromosome short tandem repeat (STR) loci. *Anal Bioanal Chem.* 375:333-343.

Li, P., Kupfer, K. C., Davies, C. J., Burbee, D., Evans, G. A. & Garner, H. R. (1997). PRIMO: a primer design program that applies base quality statistics for automated large-scale DNA sequencing. *Genomics* 40, 476–485.

Liu, D. (2011). Molecular detection of human bacterial pathogens. CRC press, New South Wales, Australia. 1278 p.

Lo, Y.M.D., Chiu, R.W.K., Chan, K.C.A. (2006). Clinical applications of PCR. Second edition. New Jersey, 211pp.

Love, M., Teebken-Fisher, D., Hose, J.E., Farmer III, J.J., Hickman, F.W. and Fanning, G.R. (1981). *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science (New York)* 214, 1139-1140. Citado em: Austin, B.; Austin, D. (2007). *Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish*. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p.

Labella, A., Vida, M., Alonso, M.C., Infante, C, Cardenas, S., Lopez-Romalde, S., Manchado, M. and Borrego, J.J. (2006) First isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *Damselae* from cultured redbanded seabream, *Parus auriga Valenciennes* in Spain. *Journal of Fish Diseases* 29, 175-179.

Lima, L. C. (2007). Doenças de Importancia Economica em Piscicultura. Citado em: III Aquafair, 2007, Belo Horizonte. VII Seminario de Aves e Suinos e III Seminario de Aquicultura, Maricultura e Pesca.. Sao Paulo : Gessuli, v. 4.

Lu, J.J., Perng, C.L., Lee, S.Y., Wan, C.C. (2000). Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 38(6): 2076-2080

Meyer, F.P. *Aquaculture disease and health management*. *J. Anim. Sci.* (1991). 69, 4201-4208.

Millennium Ecosystem Assessment, (MEA). (2003). *Ecosystems and Human Well-being*. Island Press, Washington.

Mackay, I. M., Mackay, J.F., Nissen, M.D., Sloots, T.P. (2007). Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay, p.1-40, I.M. (Ed.), *Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization*. Caister Academic Press Norfolk, UK.

Magaraggia, M.; Faccenda, F.; Gandolfi, A.; Jori, G. (2006). Treatment of microbiologically polluted aquaculture waters by a novel photochemical technique of potentially low environmental impact. *J. Environ. Monit.* 8, 923-931.

Miguel, A. (2007). Aplicação da técnica de PCR na pesquisa de bactérias patogénicas em biofilmes de condutas e reservatórios de água do sistema de distribuição da EPAL. Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico de Lisboa. Lisboa, 106 pp.

Moriarty, D. J. W. (1997). The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture*, 151, 333-349.

Motes, M. L., A. Depaola, D. W. Cook, J. E. Veazey, J. C. Hunsucker, W. E. Garthright, R. J. Blodgett & S. J. Chirtel. (1998). Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast Oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology*. 64(4): 1459-1465.

Martín, J. M.V., Tabraue R. J. H. e y Henríquez M. N. G., (2005). Evaluación de Impacto Ambiental de Acuicultura en Jaulas en Canarias. *Oceanográfica*, 110pp.

McBeath, A.J.A., Burr, K.L.-A., Cunningham, C.O. (2000). Development and use of a DNA probe for confirmation of cDNA from infectious salmon anaemia virus (ISAV) in PCR products. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 20, 130–134.

McKeever, D.J., Rege, J.E.O. (1999). Vaccines and diagnostic tools for animal health: the influence of biotechnology. *Livest. Prod. Sci.* 59, 257– 264.

Meirelles, F. S. (2010). Estudo epidemiológico das infecções bacterianas em tilápias *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), cultivadas em Pernambuco.. Tese de pós-graduação. Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, Brasil.

Mladineo, I., Miletic, I. and Bocina, I. (2006). Photobacterium damsela subsp. piscicida outbreak in cage-reared Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Journal of Aquatic Animal Health* 18, 51-54.

Mizuki, H., Whasio, S., Morita, T., Itoi, S. and Sugita, H. (2006). Distribution of the fish pathogen *Listonella anguillarum* in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery. *Aquaculture* 261, 26-32.

Muroga, K., Jo, Y. & Nishibuchi, M. (1976). Pathogenic *Vibrio* isolated from cultured eels. I. Characteristics and taxonomic status. *Fish Pathol* 11, 141–145.

Citado em: Fouz, B., Roig, F. J. & Amaro, C. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of a new fish-virulent *Vibrio vulnificus* serovar that lacks potential to infect humans. *Microbiology*, 153, 1926–1934.

Montanari, M. P., C. Pruzzo, L. Pane, & R. R. Colwell. (1999). Vibrios associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). *FEMS Microbiology Ecology*. 29:241-247.

Miyazaki, T., Jo, Y., Kubota, S.S. and Egusa, S. (1977). Histopathological studies on vibriosis of the Japanese eel *Anguilla japonica*. Part 1. Natural infection. *Fish Pathology* 12, 163-170. Citado em: Austin, B.; Austin, D. (2007). *Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish*. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p.

Nishibuchi, M. and Muroga, K. (1977). Pathogenic *Vibrio* isolated from cultured eels. IIL NaCl tolerance and flagellation. *Fish Pathology* 12, 87-92. Citado em: Austin, B.; Austin, D. (2007). *Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish*. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p..

Nishibuchi, M. and Muroga, K. (1980). Pathogenic *Vibrio* isolated from cultured eels. V. Serological studies. *Fish Pathology* 14, 117-124. Citado em: Austin, B.; Austin, D. (2007). *Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish*. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p.

Nomura, I. (2010). O futuro da pesca e da aquicultura marinha no mundo. *Cienc. Cult.* [online]. vol.62, n.3, pp. 28-32. ISSN 0009-6725.

Naylor, L.R., Goldberg, J.R., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H. e Troell, M., (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017:1024

Nutreco (2011). How can aquaculture contribute to feeding 9 billion people in 2050 in a sustainable way?

Ostrensky, A. & Boeger, W. (1998). Piscicultura: Fundamentos e técnicas de manejo. Livraria e editora Agropecuária LTDA, Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. 211 p.

Olafsen, J. (2002). Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*. 200, 223-247.

Oliver, J.D., Warner, R.A., Cleland, D.R. (1982). Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine vibrios in coastal waters of the southeastern United States. *Appl Environ Microbiol* 44:1404–1414. Citado em: Wetz, J.J., Blackwood, A. D., Fries, J. S., Williams, Z. F. Noble, R. T. (2008). Trends in total *Vibrio* spp. and *Vibrio vulnificus* concentrations in the eutrophic Neuse River Estuary, North Carolina, during storm events. *Aquatic Microbial Ecology*. Vol. 53:141-149.

Oliver, J.D., Warner, R.A., Cleland, D.R. (1983). Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* 45:985–998. Citado em: Wetz, J.J., Blackwood, A. D., Fries, J. S., Williams, Z. F. Noble, R. T. (2008). Trends in total *Vibrio* spp. and *Vibrio vulnificus* concentrations in the eutrophic Neuse River Estuary, North Carolina, during storm events. *Aquatic Microbial Ecology*. Vol. 53:141-149.

Oliver, J.D. (2005). *Vibrio vulnificus*. Citado em: Belkin SS, Colwell RR (eds) *Oceans and health: pathogens in the marine environment*. Springer, New York, p 253–276

Owens, L. (2003). Chapter 10: Diseases. Citado em: S. Lucas & P. C. Southgate (Eds.), *Aquaculture: farming aquatic animals and plants*. (pp. 199-214). Oxford: Fishing News Books, Blackwell Publishing Ltd.

Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L. and Romalde, J.L. (1999). 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR

method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2942-2946.

Persing, D.H. (1993). Target Selection and Optimization of Amplification Products. In *Diagnostics Molecular Microbiology: Principles and Applications*, ASM (ed), pp 88- 104. Washington DC: ASM

Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A., Hays, J.P. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification, Springer, 332 pp.

Pillay, T.V.R & Kutty, M.N. (2005). Chapter 9: Health and Diseases. In *Aquaculture: principles and practices*. (2nd ed.). (pp. 201-245). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.

Proutski, V. & Holmes, E. C. (1996). PrimerMaster: a new program for the design and analysis of PCR primers. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 253–255.

Reis, J. L. S. (2010). A importância das pescas para a economia nacional - uma análise exploratória. Tese de Mestrado. Universidade de Aveiro.

Remoundou, K., Koundouri, P., Kontogianni, A., Nunes, P.A.L.D., Skourtos, M. (2009). Valuation of natural marine ecosystems: an economic perspective. *Environmental science & policy*. 1040-1051.

Ronaghi, M. et al. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, v.281, p.363–365. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/281/5375/363>.

Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research*, v.11, p.3-11. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/content/11/1/3.long>.

Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.

Rychlik, W. & Rhoads, E. R. (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing, and in vitro amplification of

DNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 8543–8551. Citado em: Yuryev, A. (2007). PCR Primer Design. *Methods in molecular biology*. 402. Humana Press.

Singh, V.K. & Kumar, A. (2001). PCR Primer Design. *Mol. Biol. Today* 2: 27-32.

Shao, M., Ma, Y., Liu, Q. and Zhang, Y. (2005). Secretory expression of recombinant proteins in an attenuated *Vibrio anguillarum* strain for potential use in vaccines. *Journal of Fish Diseases* 28, 723-728.

Shao, Z. (2001). Aquaculture pharmaceuticals and biological: current perspectives and future. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 50, 229-243.

Sawyer, D., Pestka, J.J. (1985). Foodservice systems: presence of injured bacteria in foods during food product flow. *Ann.Ver. Microbiol.*, v. 39, p. 51-67. Citado em: Masson, M. L. & Pinto, R. A. (1998). Perigos potenciais associados ao consumo de alimentos derivados de peixe cru. *B.CEPPA, Curitiba*, v. 16, n. 1, p. 71-84.

Smail, D.A. & Munro, A.L.S. (2004). 6: The virology of teleosts. In R.J. Roberts (Ed.), *Fish pathology*. (3rd ed.). (pp. 169-253). U.K. & U.S.A.: W.B. Saunders, Elsevier Limited.

Snieszko, S.F. (1964). Remarks on some facts of epizootiology of bacterial fish diseases. *Developments in Industrial Microbiology* 5, 97-100. Citado em: Austin, B.; Austin, D. (2007). *Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish*. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p.

Smith, S.K., Sutton, D.C., Fuerst, J.A. and Reichelt, J.L. (1991). Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* (Love et al.) MacDonell & Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 529-534.

Smith, W.S. (2005). As introduções de espécies de peixes exóticos e alóctones em bacias hidrográfica brasileiras. Citado em: ROCHA, O. Et al. *Espécies*

invasoras em águas doces – estudos de caso e propostas de manejo. São Carlos: UFSCar, p.25-44.

Shuber, A.P., Skoletsky, J., Stern, R., Handelin, B.L. (1993). Hum Mol Genet 2:153–158. Citado em: Schoske, R., Vallone, P.M., Ruitberg, C. M., Butler. J. M. (2003). Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10y chromosome short tandem repeat (STR) loci. Anal Bioanal Chem. 375:333-343.

Sorum, H., Hvaal, A.B., Heum, M., Daae, F.L. and Wiik, R. (1990). Plasmid profiling of *Vibrio salmonicida* for epidemiological studies of cold-water vibriosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). Applied and Environmental Microbiology 56, 1033-1037.

Toranzo, A. E., Magariños, B.;Romalde, J.L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture. 246, 37-61.

Thyssen, A. & Ollevier, F. (2005). Genus II. *Photobacterium* Beijerinck 1889, 401AL, in Brenner, D.J., Krieg, N.R. & Staley, J.T. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol. 2, Springer, New York, pp. 546-552.

Taveira, N. (2000). Detecção e Identificação Molecular de Microrganismos. In *Microbiologia*, Lidel ET (ed), Vol. 2, 1, pp 3-37. Porto: Lidel

Tamplin, M. L. (1994). The ecology of *Vibrio vulnificus*. Citado em: U. S. FDA. Proceedings of the 1994 *Vibrio vulnificus* workshop. Washington D. C., 75-86.

Toranzo, A.E., Barja, J.L. and Hetrick, F.H. (1982). Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in estuarine and freshwaters. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 3, 43-45. Citado em: Austin, B.; Austin, D. (2007). Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish. 4ª Edição. Editora Springer. Chichester, UK. 552 p.

Valenti, W. C. et al. (2000). Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPQ / Ministério da Ciência e Tecnologia.

Wagener, C., (1997). Molecular diagnostics. J. Mol. Med. 75, 728– 744.

West, P. A. (1989). The human pathogenic vibrios - a public health update with environmental perspectives. *Epidemiology and infectiology*. 103:1-34. Citado em: Castro-Silva, M. A. (2003). Ocorrência e caracterização de *Vibrio vulnificus* isolados de amostras de molusco e água de áreas de cultivo de Santa Catarina. Tese de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Brasil.

Wilson, I.G., (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741–3751.

Wilson, M., R. McNab, and B. Henderson. (2002). *Bacterial disease mechanisms: An introduction to cellular microbiology.*, Cambridge univeristy Press, Cambridge, UK.

Wright, A. C., R. T. Hill, J. A. Johnson, M. C. Roghman, R. R. Colwell & J. G. Morris. (1996). Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(2): 717-724.