



## II ACÇÃO DE TRANSFERÊNCIA

Potencial da aplicação de ferramentas bioquímicas e moleculares na investigação em aquacultura: identificação bacteriana

Cofinanciado por:

## Potencial da aplicação de ferramentas bioquímicas e moleculares na investigação em aquacultura: identificação bacteriana

A ocorrência de patologias de peixes marinhos de origem bacteriana, requer a sua identificação rápida para um melhor sucesso no tratamento e prevenção e consequente controlo da mortalidade. O uso de técnicas bioquímicas aliadas às ferramentas moleculares torna-se uma mais valia no controlo deste tipo de patologias

Com esta ação pretende-se dar a conhecer as principais bactérias que afectam os peixes marinhos produzidos em aquacultura e a forma de fazer a sua identificação usando ferramentas convencionais e mais modernas, nomeadamente moleculares. Este curso é dirigido ao pessoal do sector da aquacultura que faça diagnóstico de patologias, técnicos de laboratório, estudantes de mestrado, entre outros.

## II ACÇÃO DE INTERACÇÃO – 23 e 24 de Agosto de 2018

### Potencial da aplicação de ferramentas bioquímicas e moleculares na investigação em aquacultura: identificação bacteriana

Local: EPPO – Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

1º dia	
10:00 – 10:15	<b>Receção dos participantes</b>
10:15 – 11:00	<b>Principais bactérias que afetam os peixes em aquacultura marinha (Teórica)- Florbela Soares (IPMA)</b>
11:00-11:30	<i>Intervalo para café</i>
11:30 -12:30	<b>Isolamento bacteriano em peixes (Prática)- Márcio Moreira (IPMA)</b>
12:30-14:00	<i>Intervalo para almoço</i>
14:00 – 17:00	<b>Identificação bacteriana por métodos bioquímicos (Prática)- Márcio Moreira (IPMA)</b>
2º dia	
10:30 –12:30	<b>Análise dos resultados da identificação bioquímica de bactérias (Prática)- Márcio Moreira (IPMA)</b>
12:30 – 14:00	<i>Intervalo para almoço</i>
14:00 – 16:00	<b>Identificação molecular de bactérias (Teórico-prática)- Cátia Marques (IPMA)</b>
16:00 – 16:30	<i>Intervalo para café</i>
16:30 – 17:00	<b>Discussão e encerramento – Florbela Soares, Cátia Marques e Márcio Moreira (IPMA)</b>

(2ª Edição)

## II ACÇÃO DE INTERACÇÃO –

28 de Fevereiro e 1 de Março de 2019

### Potencial da aplicação de ferramentas bioquímicas e moleculares na investigação em aquacultura: identificação bacteriana

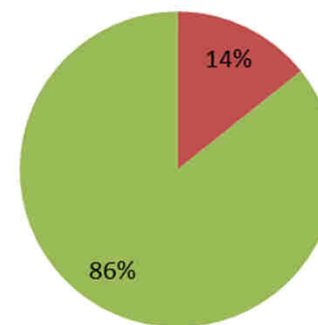
Local: EPPO – Estação Piloto de Piscicultura de Olhão



**Total participantes nas 2 acções: 24**

### Área actividade participantes

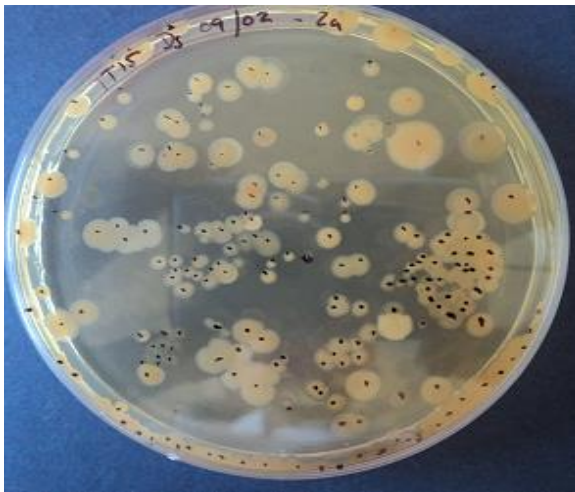
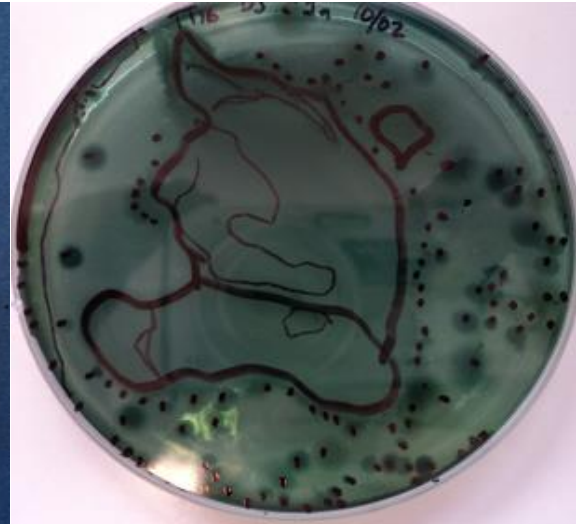
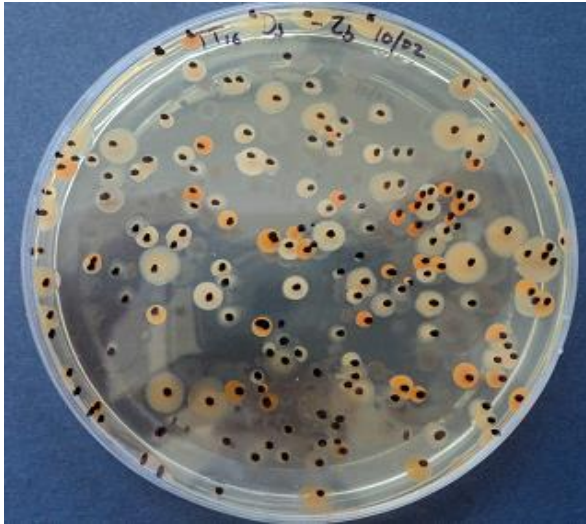
■ Outros ■ Empresa/sector ■ Investigação





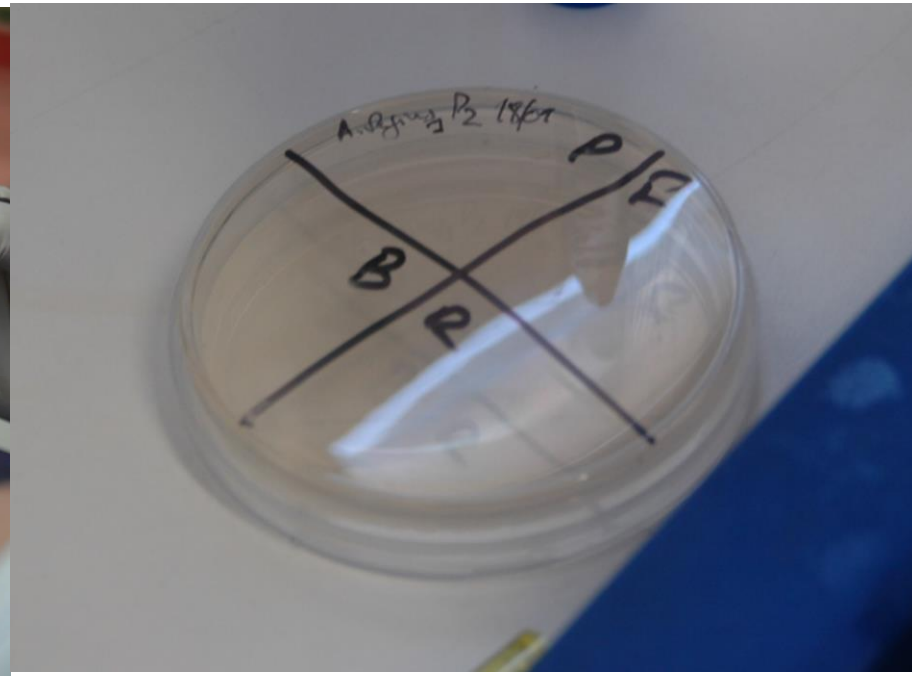
## Principais bactérias que afetam os peixes em aquacultura marinha

# Bactérias



## EXAME BACTERIANO

- Amostragem bacteriológica em meios apropriados (incubação 22°C)
- Tecidos amostrados: Rim anterior, baço e fígado
- Isolamento bacteriano
- Identificação (morfologia, bioquímica, testes serológicos e moleculares)



**A lista de bacterias isoladas de peixes doentes é longa.**

**A maioria dessas bacterias são oportunistas.**

**Algumas são patogénicas e normalmente relacionadas com mortalidades na produção de peixes marinhos.**

## **Pasteurellosis:**

*Photobacterium damsela* sp. *piscida*

## **Vibriosis:**

*V. anguillarum*,

*V. alginolyticus*

*V. harveyi*

*V. fischeri*

*V. vulnificus*

## **Flexibacteriosis – Myxobacteriosis**

*Tenacibaculum maritimum* (Tenacibaculosis)

*Flexibacter* spp.



- **Patógeno obrigatório**
- **Transmissão vertical (sémen, fluido ovárico, ovos, etc) e horizontal**
- **Ampla dispersão geográfica (Portugal, Espanha, Itália, França, Grécia, Israel, Turquia, Malta etc)**
- **A patologia ocorre quando a temperatura está acima dos 20° C**
- **18-20 °C: os peixes podem ser infectados**
- **16 - 17 °C: mortalidade de peixe nas hatcherys**

**1963 *Roccus americanus*, Chesapeake Bay, USA**

**1969 *Seriola quinqueradiata*, Japão**

**1990 Mediterrâneo**

**1991 Espanha**

**1995 Portugal**

# PASTEURELLOSIS

- **Anorexia**
- **Pele escura**
- **Internamente:  
baço escuro, maior  
e com nódulos  
brancos**



# PASTEURELLOSIS



# PASTEURELLOSIS



# PASTEURELLOSIS



**Nódulos brancos no baço**

## Prevenção

- **Vacinação dos reprodutores e juvenis**
- **O uso de imunoestimulantes e vitaminas é recomendado**
- **Boas práticas de higiene e desinfeção**

## Tratamento

- **O tratamento com antibióticos deve ser escolhido com base nos resultados do antibiograma**

**Tratamentos sistemáticos de prevenção com antibióticos não são recomendados**





# ***Vibriosis***

***Vibrio* spp. têm sido isolados frequentemente de peixes doentes em várias pisciculturas na bacia Mediterrânica.**

**Mortalidades em dourada de aquacultura têm estado associadas com:**

***V. alginolyticus,***

***V. parahaemolyticus,***

***V. vulnificus,***

***V. harveyi,***

***V. ordalii,***

***V. salmonicida, and V. anguillarum***

# Vibriosis

As Vibrioses são caracterizadas por uma septicemia hemorrágica causando: Letargia, pele escura, exoftalmia, brânquias anémicas, inflamação e úlceras são **sinais externos típicos**.

**Internamente**, derrames viscerais, hemorragias intestinais, e acumulação de fluido ascítico na cavidade abdominal são os sinais mais comuns da vibriose.

Factores tais como stress associado ao transporte, alterações na temperatura da água, maneio, e oxigénio baixo podem causar vibriose em *S. aurata*

# Vibriosis

O tratamento das vibrioses com alimento medicado pode ser **efectivo** se for feito na fase inicial da doença, enquanto os peixes ainda estão a comer.

O tratamento tem de ser feito com base num **antibiograma**: Flumequina, oxitetraciclina, sulfonamidas (+ trimethoprim) and florfenicol são os antibióticos mais comuns usados para o tratamento da vibriose.

**A vacinação é a melhor opção como medida preventiva** uma vez que a sua eficiência ronda os 100% durante o período de proteção usando quer o procedimento de imersão quer de injeção.

# *Vibriosis*

Boas práticas de manejo e nutrição adequada são essenciais para prevenir o desenvolvimento da doença e consequentemente o uso de antibióticos.

A emergente crise de resistência aos antibióticos tem levado ao uso de probióticos em cultivos de peixe.

# ***Vibriosis***

- **Muitas espécies de *Vibrionaceas* têm sido descritas como patogénicas para dourada e robalo**
- **A estirpe mais frequentemente isolada dos peixes moribundos é *Vibrio anguillarum*.**

# *Vibrio anguillarum*

- A doença ocorre quando a temperatura está entre os 15 e 20°C.
- No inverno com temperaturas baixas é observada a forma crónica da doença.

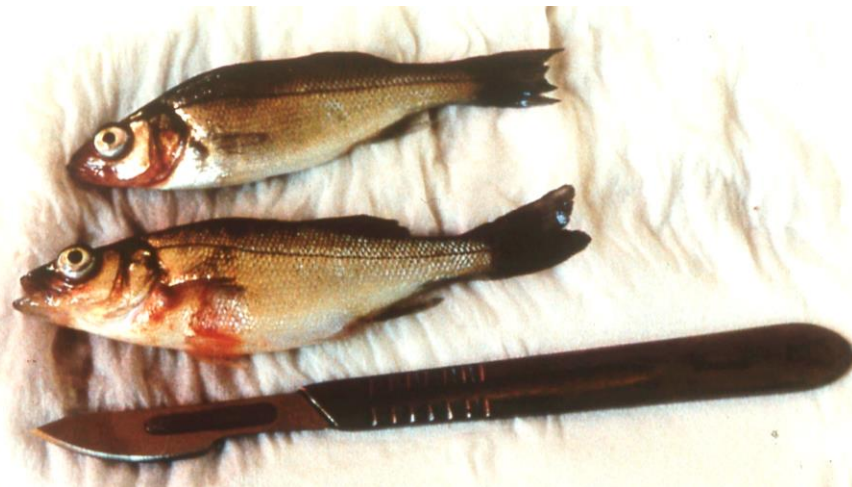




## *Vibrio anguillarum*

- **Patógeno obrigatório mais comum**
- **Afecta apenas juvenis e adultos de robalo, mas ainda não foi descrito para dourada**
- **Sintomas clínicos externos: boca vermelha, exoftalmia, barbatanas e área peri-anal hemorrágica**
- **Internamente: septicemia hemorrágica, baço inchado**

# *Vibrio anguillarum*



**hemorragias na pele**



# *Vibrio anguillarum*



## Prevenção

- **Minimizar situações de stress reduzirá o risco da ocorrência de patologias**
- **O uso de vacinas é recomendado**
- **Boas práticas de higiene com desinfecção sempre que necessário**

# VIBRIOSIS causadas por outras

## *Vibrionaceae*

*V. alginolyticus, V. harvey,  
V. vulnificus, V. splendidus*

- Oportunistas (patógenos secundários)
- Fazem parte da flora normal da água
- Ocorrem com temperaturas diversas
- Associados com manipulações (lesões mecânicas na pele), stress, qualidade da água , parasitas
- Sintomas: inespecíficos



- **Ocorre durante todo o ano (qualquer temperatura)**
- **Mortalidade por vezes superior a 20%**
- **Necrose e úlceras na pele**
- **Excesso de produção de muco**



- **Problema comum em robalo, dourada e linguado**
- **A sua identificação não é fácil**



## **Prevenção**

- **Evitar situações de stress e que causem lesões mecânicas, reduz o risco de infeção**
- **Boas práticas de desinfeção**

Ocorre durante a engorda e está associada com a deficiência em vitaminas na dieta, nomeadamente vitamina C e B.

Granulomas, localizam-se sobretudo na zona perivascular em vários órgãos (rim, baço, fígado e coração) e está associado com reações inflamatórias e hemorragias.

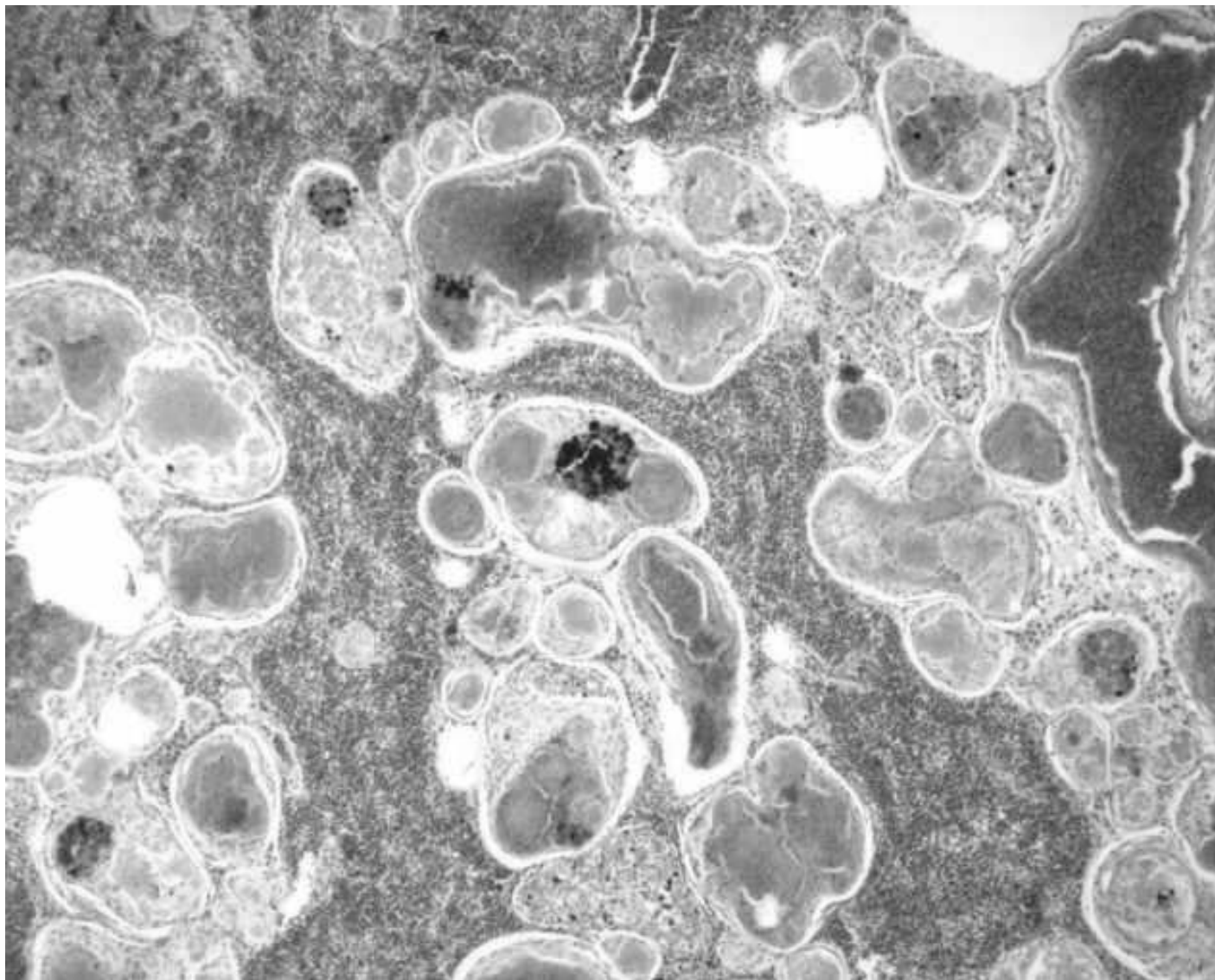
Actualmente na Grécia, a granulomatose afecta 100% das corvinas produzidas.

A sua etiologia é desconhecida estando associado a baixas mortalidades.

(Ghittino et al. 2004)



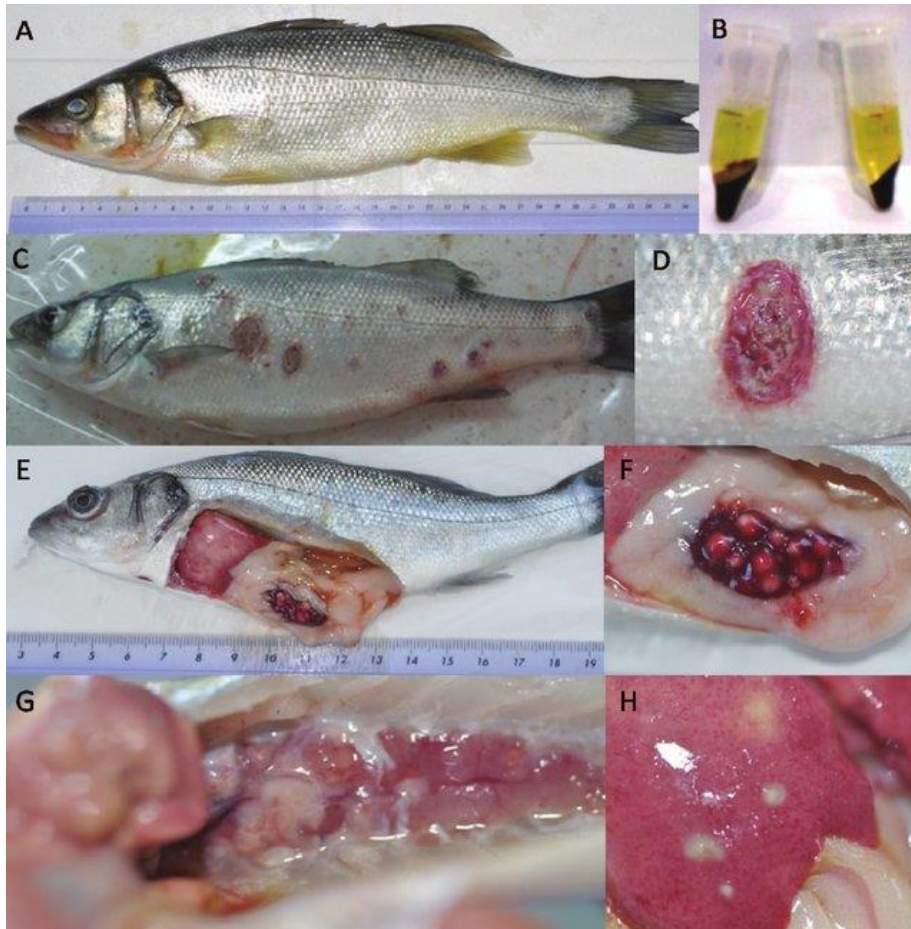




**(Ghittino et al. 2004)**

**Ghittino et al. (2004) em Italia relata a presença de Nocardia like em corvina como agente causador da granulomatosis.**

# Bactéria associada com elevada morbilidade e mortalidade em robalo (Grécia).

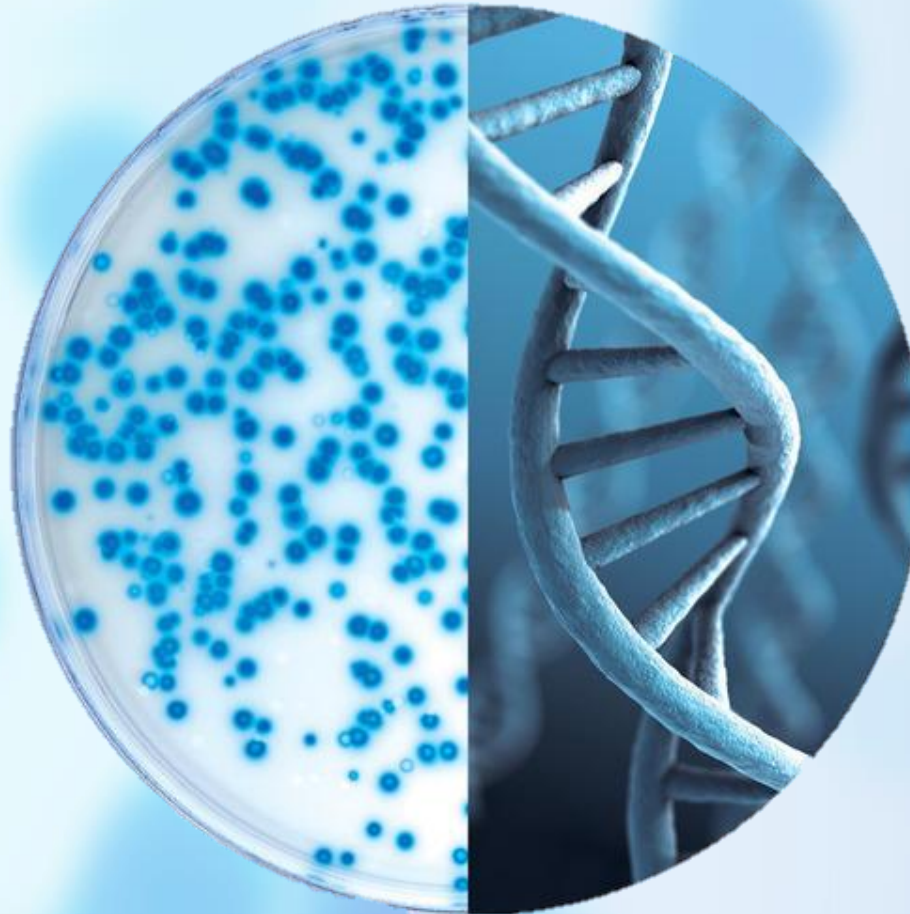


- A) Robalo afectado.
- B) Plasma de côr amarela indicador de problemas no fígado.
- C) Robalo com ulceras na epiderme.
- D) Ulceras na epiderme com granulomas visíveis.
- E) Esplenomegalia.
- F) Numerosos nódulos esbranquiçados no baço.
- G) Rim inflamado com necrose focal.
- H) Focos necróticos no fígado.

(Smyrli et al, 2017)



OBRIGADA



# Identificação molecular de bactérias



# As técnicas de biologia molecular como complemento à identificação convencional

# Identificação de microrganismos

Pode ser feita de várias formas:

- Fenotípica-morfológica (análise micro e macroscópica)
- Imunológica (análise serológica)
- **Genotípica (técnicas moleculares)**

A escolha do método de identificação deverá depender do grau de detalhe que se pretende

# Métodos genotípicos

Envolve a análise do material genético do microrganismo em causa



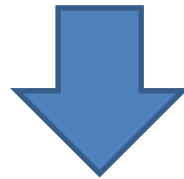
Revolucionou o campo da identificação microbiológica (permitindo uma melhor classificação filogenética)

**Têm-se tornado um método preferencial para identificação microbiológica devido à sua fiabilidade e rapidez**

# Ferramentas moleculares

Avanço de técnicas moleculares permitiu o desenvolvimento de várias ferramentas

Deteção de variações muito pequenas entre microrganismos (mesmo dentro da mesma estirpe)



**Novas perspetivas**



# Métodos genotípicos

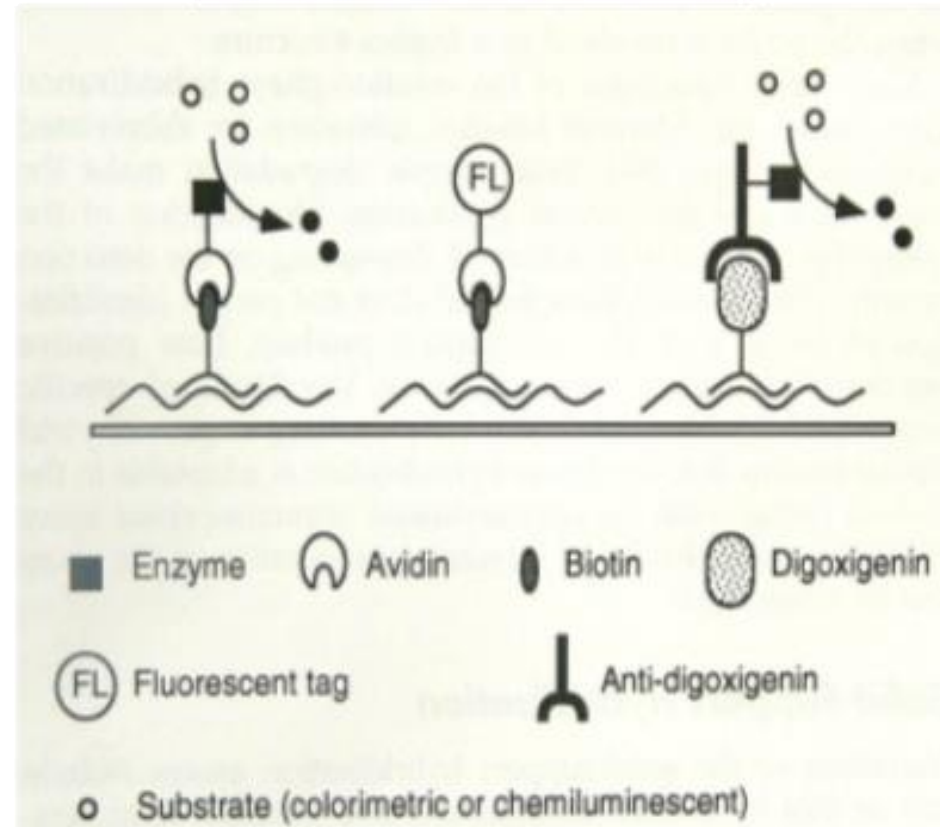
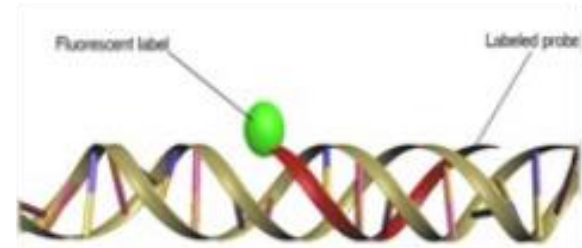
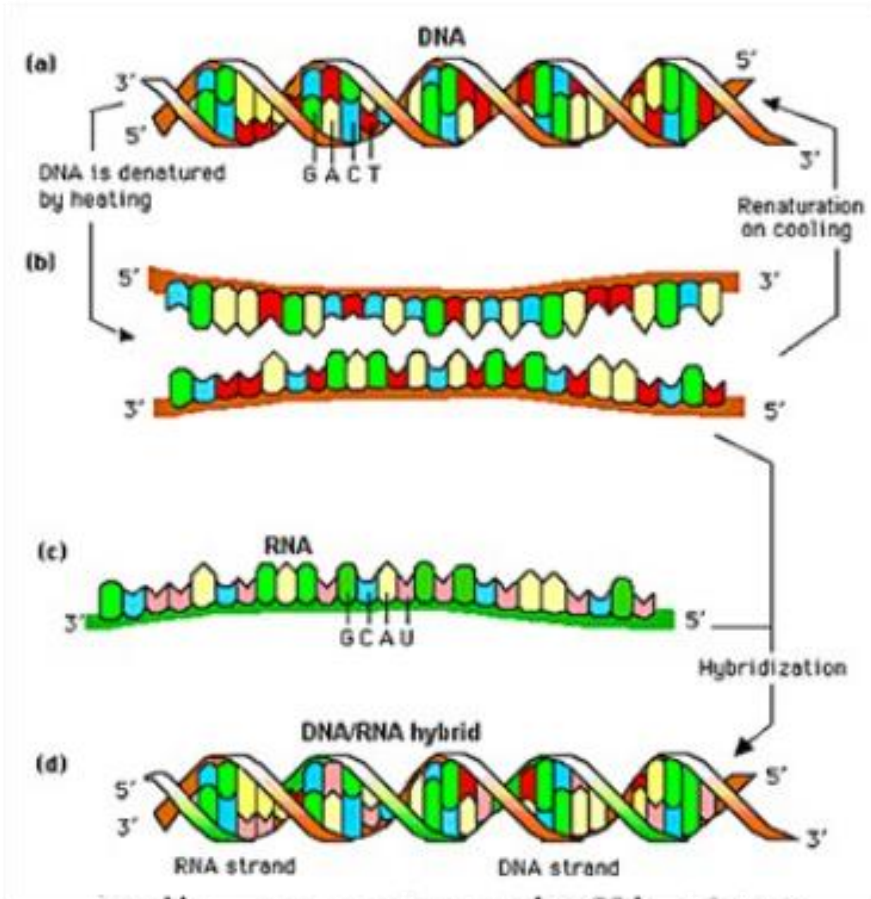
Incluem:

- Sondas de ácidos nucleicos
- PCR (Real time-PCR, RAPD-PCR)
- Sequenciação de ácidos nucleicos
- RFLP
- “impressão digital” dos plasmídeos

# Sondas de ácidos nucleicos

Hibridação de sondas **específicas** que reconhecem uma determinada região (normalmente o 16S rRNA)

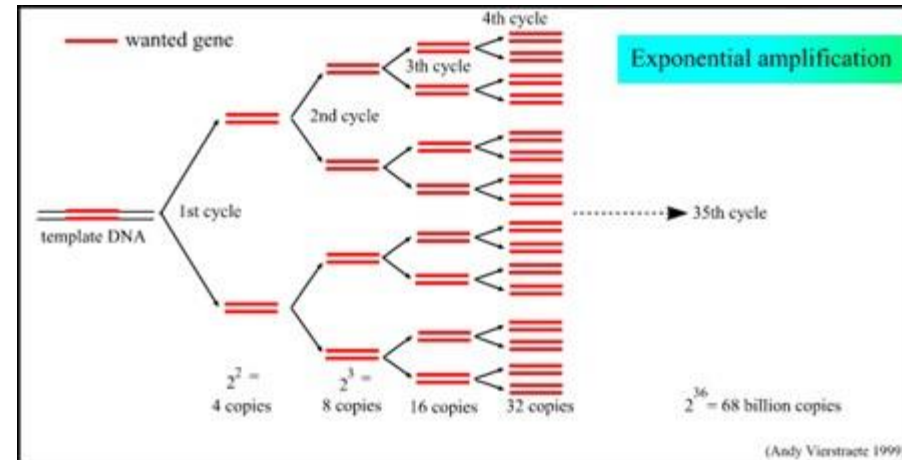
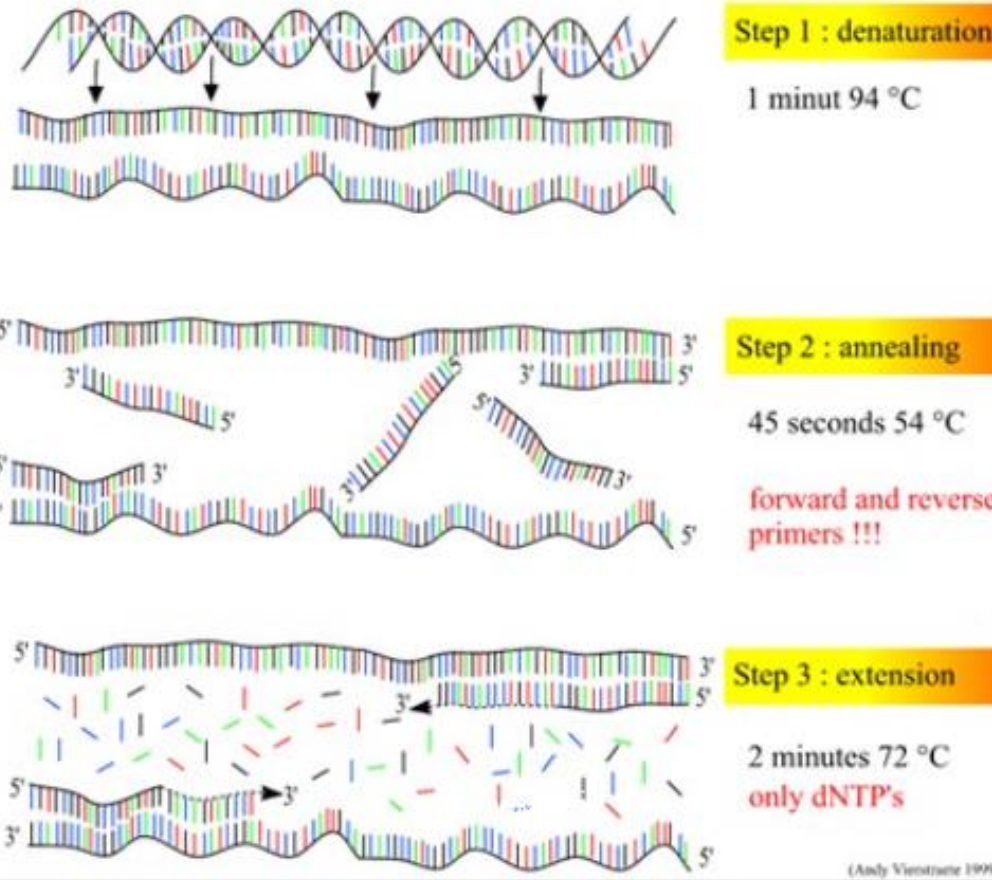
- Cadeias simples de ácidos nucleicos;
- Marcadas molecularmente para permitir identificação (fluorescência)
- Altamente específicas para as sequencias alvo



# PCR – Polymerase Chain Reaction

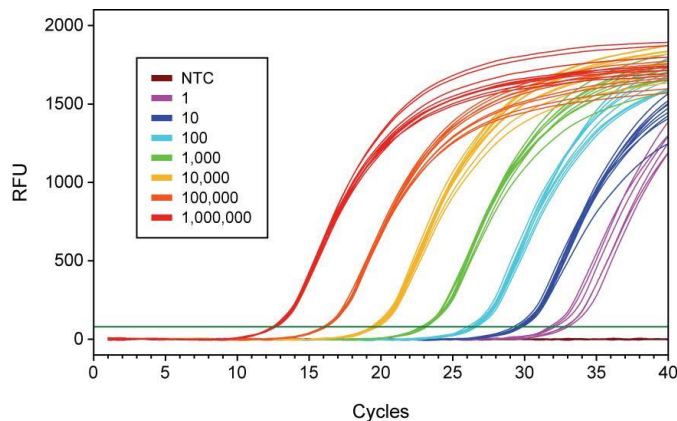
## Princípio básico da técnica:

30 - 40 cycles of 3 steps :



# Real time PCR

- Envolve o uso primers específicos;
- Equipamento monitoriza a amplificação e apresenta um gráfico da abundância ao longo do tempo;
- Resultados imediatos



# RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA)

primers “random” (cerca de 10 monómeros) que geram um perfil de DNA



Identificação de microrganismos

- Não é necessário purificar o DNA;
- Pouco trabalhoso;
- Não é necessário o conhecimento prévio do genoma;

# Sequenciação de ácidos nucleicos

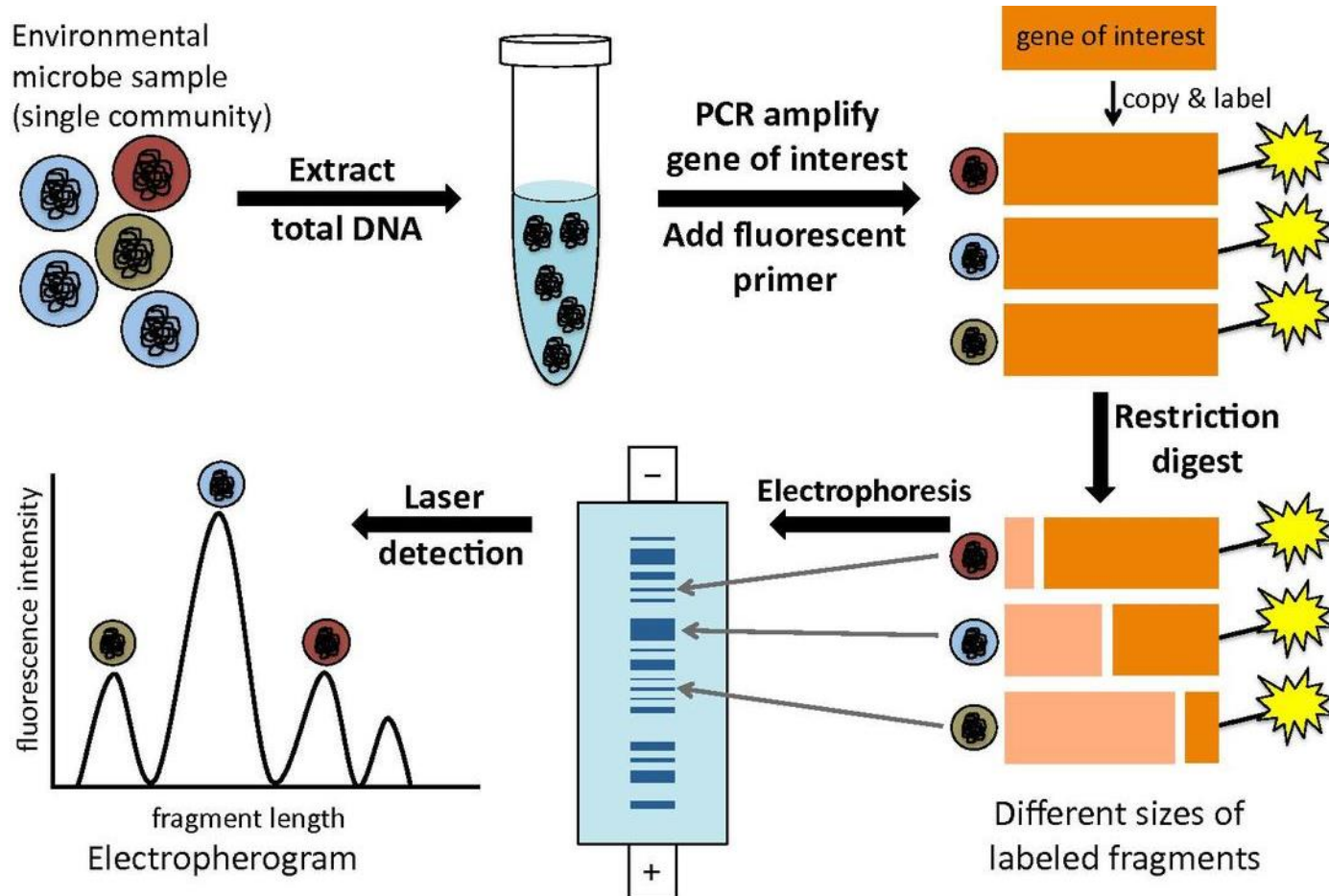
- Pode amplificar-se uma região específica (normalmente o 16s rRNA) ou todo o genoma;
- Apresenta uma boa reprodutibilidade e é altamente eficaz;
- São necessários 2 a 3 dias;
- Método dispendioso;

# RFLP

- Recolha das amostras microbiológicas
- Extração de DNA total;
- Amplificação do fragmento de interesse;
- Digestão com enzimas de restrição;
- Separação por eletroforese;
- Análise e comparação dos padrões de restrição;

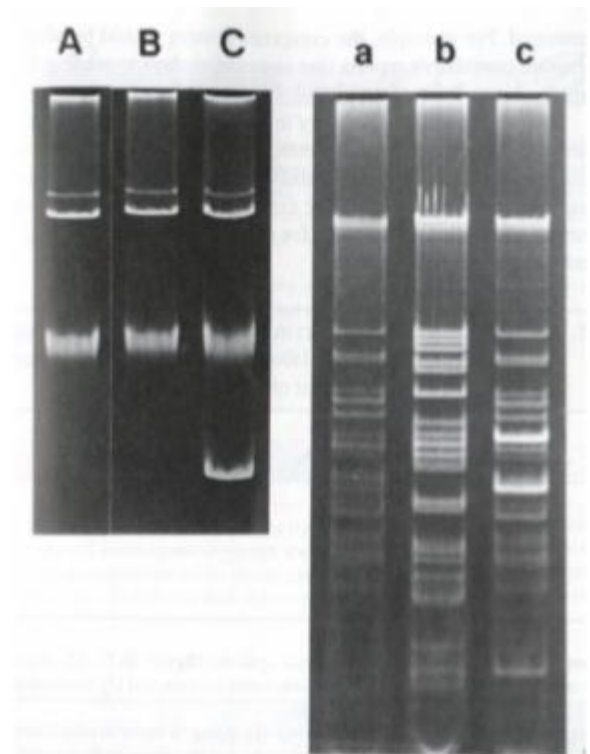


# RFLP



# “Impressão digital” dos plasmídeos

- Crescimento das várias estirpes, lise e recolha do material genético;
- Separação dos plasmídeos por eletroforese;
- Análise e comparação dos padrões obtidos;



**Irão as técnicas moleculares substituir por completo os métodos convencionais?**

# Técnicas moleculares

## Vantagens gerais:

- Grande especificidade e sensibilidade;
- Tempo de resposta rápido;
- Método de confirmação;
- Permite a identificação de organismos não viáveis ou difíceis de cultivar *in vitro*;
- Necessita de uma reduzida quantidade de amostra;

# Visão geral

Método	Exemplos de aplicação	Sensibilidade	Especificidade	Vantagens	Desvantagens
Convencional (base celular)	Cultura em meios (sólido/líquido), microscopia, coloração, bioquímicos	Boa/Excelente	Boa	Barato, qualitativo e quantitativo	Microrganismos têm que crescer <i>in vitro</i> , trabalhosos, moroso
Imunológicos	ELISA, ensaios serológicos, microarrays	Moderada/Boa	Moderada/Boa	Alto rendimento, rápido, relativamente barato, fácil de usar, quantitativo e qualitativo	Baixo limite de deteção para microrganismos pouco abundantes, dificuldade na obtenção de anticorpos específicos
Ácidos nucleicos	Hibridação	Moderada/Boa	Excelente	Rápido e fácil de usar	Baixo limite de deteção para organismos pouco abundantes, pré-cultura necessária, não é possível a deteção de organismos desconhecidos
	PCR	Excelente	Excelente	Rápido, fácil de usar, baixa quantidade de amostra, qualitativo e quantitativo	Não é possível a deteção de organismos desconhecidos
	Sequenciação	Boa/Excelente	Excelente	Informação detalhada, permite detetar novos organismos	Baixo limite de deteção para organismos pouco abundantes, caro e moroso

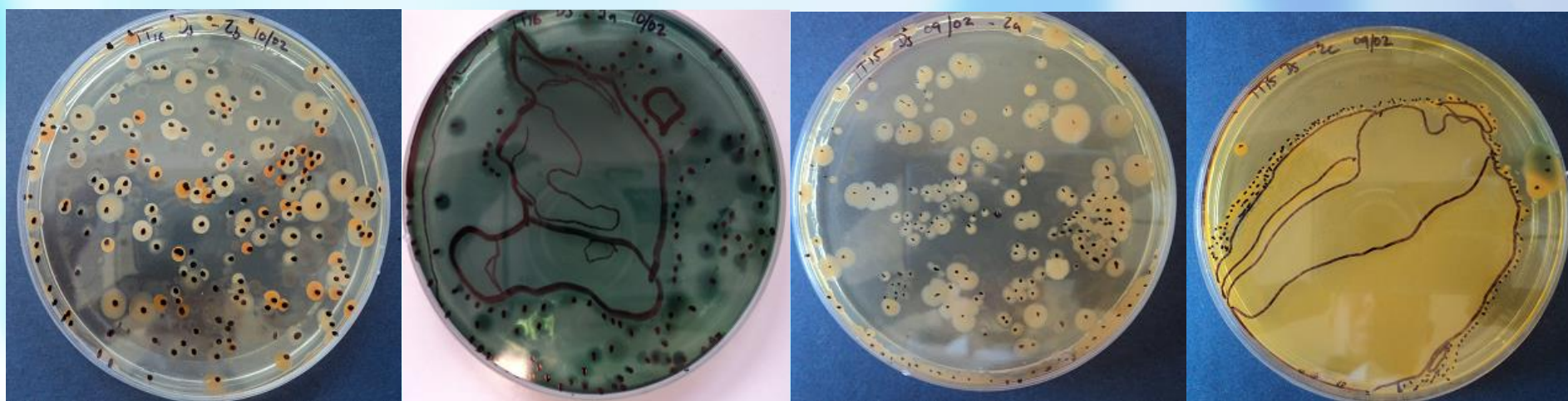
# Que método escolher?

## Depende sempre do objetivo final

- Nível de especialização necessário;
- Quanto tempo temos para a obtenção de resultados?
- Sensibilidade necessária;
- Custo;

# Perguntas?





## Identificação bacteriana através de testes bioquímicos





# Análises bacterianas na EPPPO-IPMA

Água



Bivalves



Peixes



Sistemas de esterilização



Análises bacterianas

Detecção de agentes patogénicos

Verificação de sistemas de esterilização

Caracterização da comunidade microbiana

## Análises bacterianas

Detecção de  
agentes  
patogénicos

Verificação de  
sistemas de  
esterilização

Caracterização  
da comunidade  
microbiana

Crescimento bacteriano

Isolamento de  
colónias

Identificação  
agente  
patogénico

Antibiograma

**Tratamento**

## Análises bacterianas

Detecção de  
agentes  
patogénicos

Verificação de  
sistemas de  
esterilização

Caracterização  
da comunidade  
microbiana

Crescimento bacteriano

Crescimento bacteriano

Isolamento de  
colónias

Antibiograma

**Contagem de bactérias totais e de  
Vibrionaceae**

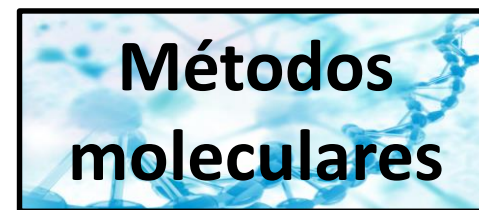
Identificação  
agente  
patogénico

**Tratamento**

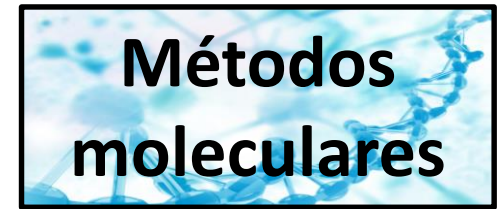
Isolamento de colónias

Identificação de bactérias

## Identificação bacteriana



## Identificação bacteriana



## Análises a realizar

- ✓ Forma e cor da colónia;
- ✓ Forma e mobilidade das bactérias;
- ✓ Luminescência;
- ✓ Teste Gram / Método Levi;
- ✓ Oxidase;
- ✓ Catalase;
- ✓ Oxidação/Fermentação (Teste OF);
- ✓ Crescimento em TCBS;
- ✓ Crescimento a 0, 3, 5, e 10% sal);
- ✓ Teste meio TSI (Triple Sugar Iron Agar);
- ✓ Amilase;
- ✓ Galeria API 20NE para testes complementares (Urease, esculina, gelatinase, ONPG, metabolização de diversos substratos, por exemplo).



AQUATRANSFER



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu  
dos Assuntos Marítimos  
e das Pescas

