



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Cátia Filipa Magalhães Ferreira

Desenvolvimento
e validação do método LNA-FISH para
deteção de *Aeromonas*

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Bioengenharia

Trabalho efetuado sob a orientação de
Professora Doutora Maria João Vieira
Doutora Carina Almeida

Outubro de 2016

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer á minha orientadora, Doutora Maria João Vieira, pela oportunidade de realizar este projeto, por toda a simpatia e aconselhamento científico.

Agradeço também à minha co-orientadora, Doutora Carina Almeida, ao qual a sua orientação enriqueceu muito a minha experiência. Obrigada por todos os conselhos, críticas e sugestões durante a orientação. Agradeço todo o apoio e a enorme paciência ao longo do trabalho.

Agradeço á Biomode pela oportunidade que me deram de realizar o meu trabalho.

Obrigada ao Mário e ao Rui por toda a disponibilidade e paciência que sempre demonstraram. Pelo bom ambiente no laboratório que sempre proporcionaram e por todo o incentivo e apoio.

Um obrigada à Chica, por toda a disponibilidade sempre demonstrada e por todo o apoio e força. Obrigada pela tua amizade e por todos os bons momentos proporcionados.

A todos os amigos que estiveram sempre do meu lado, sempre com bons conselhos e momentos, um sincero obrigada.

Ao meu namorado, Luís, que esteve presente nos momentos mais difíceis, por todo o apoio, carinho e amor. Muito obrigada por tudo.

À minha família, especialmente aos meus pais e irmã, que sempre me apoiaram e me deram força para superar esta etapa importante da minha vida.

Um obrigada a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

RESUMO

Um potencial problema em aquacultura são as infecções bacterianas que são facilmente transmissíveis podendo contaminar uma grande variedade de espécies de peixes, levando a grandes perdas económicas.

O género *Aeromonas* compreende um grande número de espécies patogénicas para peixes, e representa uma das principais causas de perdas na aquacultura.

Torna-se necessário a melhoria de métodos para o diagnóstico e controlo deste patógeno de forma a minimizar o seu impacto. A utilização de técnicas moleculares tem sido mencionada como alternativa viável para detetar e diagnosticar surtos de doenças, prevenindo perdas económicas em aquacultura.

O método de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) tem sido muito explorado na área da microbiologia alimentar. É um método de deteção simples, rápido e altamente sensível que utiliza sondas marcadas por fluorescência cujo alvo são regiões específicas de ácido ribonucleico (RNA) bacteriano. Este método tem sofrido um desenvolvimento notável devido à aplicação de moléculas sintéticas na construção das sondas, que tornam o FISH mais rápido, robusto e sensível.

Neste trabalho o principal objetivo foi o desenvolvimento e otimização de uma sonda para deteção de *Aeromonas* spp com recurso a uma molécula sintética, o LNA (*locked nucleic acid*). Uma completa otimização não foi conseguida, pois apesar dos vários parâmetros testados e da elevada afinidade da sonda, não foi possível eliminar completamente a hibridação cruzada com espécies não -*Aeromonas*.

Foi possível verificar que a eficiência da sonda depende de uma relação muito forte entre o tipo/concentração de desnaturante e a concentração salina usada na solução de hibridação. Para melhor compreender este efeito a assim passar de uma otimização baseada numa abordagem tentativa-erro, para uma abordagem baseada em modelos da cinética de hibridação, usou-se a “*response surface methodology*” (RSM). RSM é uma ferramenta matemática e estatística que permite modelar e analisar problemas influenciados por inúmeras variáveis de forma a encontrar uma aproximação razoável do relacionamento real entre esse conjunto de variáveis. Foi possível perceber que, dos três desnaturantes testados, a Ureia foi a que permitiu obter um maior sinal de hibridação, previsto a ocorrer a uma temperatura de hibridação de 50°C para 5M de NaCl numa concentração de Ureia de 4M.

ABSTRACT

A potential problem in aquaculture are bacterial infections that can easily be transmitted and may contaminate a wide variety of fish species, leading to major economic losses.

The genus *Aeromonas* comprises a large number of species pathogenic to fish, which can cause infections worldwide and is a major cause of losses in aquaculture.

It is necessary to improve methods for rapid diagnosis and control of this pathogen in order to minimize its impact. The use of molecular techniques has been mentioned as a viable alternative to detect and diagnose disease outbreaks, preventing economic losses in aquaculture.

The fluorescent *in situ* hybridization (FISH) method has long been explored in the field of food microbiology. It is a simple detection method that uses fast and highly sensitive fluorescence probes that target specific regions of bacterial ribonucleic acid (RNA). This method has been suffering a remarkable development due to the application of synthetic molecules in the construction of probes, which make FISH faster, more robust and sensitive.

In this work, the main objective was the development and optimization of a probe for detection of *Aeromonas* spp using a synthetic molecule, LNA (locked nucleic acid).

Despite the probe high affinity; a complete optimization was not achieved because cross-hybridization with non-*Aeromonas* species was not completely eliminated.

It was possible to verify that probe efficiency is strongly dependent on a relationship between the type and concentration of denaturant and the salt concentration used in the hybridization solution. To better understand this effect and move from a trial-and-error optimization to an approach based on hybridization kinetics models, the "response surface methodology" (RSM) was used. RSM is a mathematical and statistical tool that allows to model and analyze behaviour influenced by many variables in order to find a reasonable approximation of the actual relationship between this set of variables. It can be seen that, from the three denaturants tested, the urea was the one that allowed the best hybridization signal, predicted to occur at an hybridization temperature of 50 ° C for NaCl at a concentration of 5M and Urea at 4M.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract	vii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	XV
1. Introdução Geral	1
1.1 Aquacultura	1
1.2 Aeromonas.....	2
1.2.1 O género	2
1.2.2 Virulência	4
1.2.3 Patogenicidade	4
1.3 Métodos de deteção	8
1.3.1 Métodos de deteção baseados em cultura	8
1.3.2 Métodos de deteção molecular	9
1.4 FISH.....	11
1.4.1 LNA-FISH.....	12
1.5 RSM.....	14
1.6 Objetivos.....	15
2. Desenho da sonda	17
2.1 Primrose.....	17
.....	17
2.2 Probe match	20
3. Otimização Experimental da Sonda.....	27
3.1 Métodos Laboratoriais	27
3.1.1 Microrganismos e condições de cultura	27
3.1.2 Método FISH.....	27
3.1.3 Determinação da sensibilidade e especificidade experimental	28

3.1.4	Desenho experimental e análise estatística por RSM.....	28
3.2	Resultados e discussão.....	31
3.2.1	Otimização da sonda	31
3.2.2	Teste de especificidade da sonda de <i>Aeromonas</i> spp.....	37
3.2.3	Modelo de regressão de resposta e determinação das condições ótimas	40
4.	Conclusão e trabalho futuro	48
	Bibliografia.....	50
	Anexo I.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Furúnculo na superfície de uma truta arco-íris	5
Figura 1.2- Hemorragia à superfície de uma carpa.....	5
Figura 1.3- Estruturas Químicas de DNA, RNA e LNA.....	13
Figura 2.1- Construção da base de dados.....	17
Figura 2.2- Seleção das sequências alvo.....	18
Figura 2.3- Procura de potencias oligonucleótidos.....	19
Figura 2.4- Comparação dos oligonucleótidos selecionados para <i>Aeromonas</i> spp. com a base de dados 16S.....	20
Figura 3.1- Resultado da hibridação em lâmina de <i>Aeromonas</i> IR 13 AH, obtido por o microscópio de fluorescência, com o respetivo controlo negativo.....	39
Figura 3.2- Resultado da hibridação em lâmina de <i>Vibrio fluvialis</i> M44, obtido por o microscópio de fluorescência, com o respetivo controlo negativo.....	39
Figura 3.3- Intensidade de fluorescência observada vs intensidade de fluorescência prevista para a Formamida.....	43
Figura 3.4- Intensidade de fluorescência observada vs intensidade de fluorescência prevista para a ureia	43
Figura 3.5- Intensidade de fluorescência observada vs intensidade de fluorescência prevista para o etileno carbonato.....	44
Figura 3.6- Superfície de resposta que representa o efeito da interação da temperatura e [NaCl] na resposta de fluorescência com uma concentração de Formamida constante de 14%.....	45
Figura 3.7- Superfície de resposta que representa o efeito da interação da temperatura e [NaCl] na resposta de fluorescência com uma concentração de Ureia constante de 4.1M.....	45
Figura 3.8- Superfície de resposta que representa o efeito da interação da temperatura e [NaCl] na resposta de fluorescência com uma concentração de Etileno Carbonato constante de 5%.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Patogenicidade das espécies de <i>Aeromonas</i>	5
Tabela 2.1– Oligonucleótidos detetadas para o género <i>Aeromonas</i> e respectivas características.....	21
Tabela 2.2- Estirpes não- <i>Aeromonas</i> detetadas pela sonda 1	21
Tabela 2.3- Estirpes não- <i>Aeromonas</i> detetadas pela sonda 2.....	22
Tabela 2.4- Estirpes não- <i>Aeromonas</i> detetadas pela sonda 3,; 4 e 5	23
Tabela 2.5- Especificidade e Sensibilidade das sondas para deteção de <i>Aeromonas</i> spp.....	23
Tabela 2.6- Avaliação de sequencias mais curtas para as sondas 1 e 3, relativamente à percentagem de GC, e valores de sensibilidade e especificidade. Vermelho- nucleótidos retirados.....	24
Tabela 2.7- Localização dos mismatches no alinhamento parcial das sondas 3, 4 e 5 com sequências da família <i>Aeromonadaceae</i> . As posições com mismatches são apresentadas a vermelho.....	25
Tabela 3.1- Desnaturantes e respetivos intervalo de concentrações usados na solução de hibridação.....	28
Tabela 3.2- Níveis experimentais das variáveis testadas para a intensidade de fluorescência relativamente ao desnaturante Formamida	29
Tabela 3.3- Níveis experimentais das variáveis testadas para a intensidade de fluorescência relativamente ao desnaturante Ureia	29
Tabela 3.4- Níveis experimentais das variáveis testadas para a intensidade de fluorescência relativamente ao desnaturante Etileno Carbonato	29
Tabela 3.5- Função dos compostos na solução de hibridação.....	31
Tabela 3.6 - Resultados do LNA-FISH para a sonda <i>AerLNA_581</i> exposta a uma solução de hibridação contendo formamida a 30% e a temperaturas de hibridação distintas. A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 900 mM de NaCl; 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.....	32
Tabela 3.7 - Resultados do LNA-FISH para a sonda <i>AerLNA_581</i> exposta a uma solução de hibridação contendo ureia a 0,5M, e a temperaturas de hibridação distintas. A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 900 mM de NaCl; 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.....	33

Tabela 3.8 - Resultados do LNA-FISH para a sonda AerLNA_581 exposta a uma solução de hibridação contendo ureia a 4M e NaCl a 150 ou 300 nM; e a temperaturas de hibridação distintas (TH). A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.....	34
Tabela 3.9 - Resultados do LNA-FISH para a sonda AerLNA_581 exposta a uma solução de hibridação contendo ureia a 4M e NaCl a 50 mM; e a temperaturas de hibridação distintas (TH). A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.....	34
Tabela 3.10 - Resultados do LNA-FISH para a sonda AerLNA_581 exposta a uma solução de hibridação contendo ureia a 4M e NaCl a 50 mM; e a temperatura de hibridação 68°C. A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.....	35
Tabela 3.11 – Resultados do LNA-FISH para a sonda AerLNA_581 exposta a diferentes concentrações de etileno carbonato na solução de hibridação e a temperaturas de hibridação distintas (TH). A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 50 mM NaCl; 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.....	36
Tabela 3.12 - Resultados teste especificidade e sensibilidade.....	38
Tabela 3.13- Níveis definidos das variáveis testadas para a formamida	40
Tabela 3.14- Níveis definidos das variáveis testadas para a ureia e etileno carbonato	41
Tabela 3.15- Análise de variância (ANOVA) para cada modelo de cada desnaturante	41
Tabela 3.16- Modelos quadráticos para Aeromonas para os diferentes desnaturantes em estudo considerando o efeito da Temperatura (X1), concentração de desnaturante (x2) e concentração de NaCl (x3) e suas interações na intensidade de fluorescência (Y)	42
Tabela 3.17- Condições ótimas de Temperatura, concentração de desnaturante e de NaCl previstos pelo modelo RSM para os vários desnaturantes testados	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

ADA-V- Meio agar ampicilina dextrina com vancomicina

APW - Água peptonada alcalina

CCD - *Central composite design*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FAO - *Food and agriculture Organization of the United Nations*

FISH - *Fluorescence in situ Hybridization* (hibridação fluorescente *in situ*)

HPLC - *High performance liquid chromatography*

LB - *Luria-Bertani*

LNA - *Locked nucleic acid* (ácido nucleico bloqueado)

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PNA - ácido nucleico peptídico

RDP II - *Ribosomal Database Project*

RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*

RNA_r - Rna ribossomal

RSM - *Response surface methodology*

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aquacultura

Nas últimas décadas a aquacultura tem contribuído significativamente para redução da escassez global de alimentos (Heuer et al., 2009). A sua produção anual triplicou nos últimos 15 anos. De acordo com as últimas avaliações estatísticas pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) a produção em aquacultura atingiu um recorde histórico de 90.4 milhões de toneladas em 2012 em que destes 66.6 milhões de toneladas são de peixe e 23.8 milhões são de algas (FAO, 2014). A aquacultura apresenta um crescimento médio anual de 8%, sendo o sector da indústria alimentar com maior crescimento nas últimas décadas (FAO, 2010). Em Portugal tem-se revelado uma área com enorme potencial de crescimento e tem-se também apresentado como uma importante alternativa no combate à diminuição dos produtos provenientes da pesca, pois apresenta vantagens nomeadamente ao nível do preço (Eurostat, 2006).

Na União Europeia as espécies mais produzidas têm sido o mexilhão, a truta arco-íris e o salmão do atlântico (Eurostat, 2006). No nosso país, as espécies aquícolas mais produzidas são a truta e a dourada em água doce; pregado e ameijoas em águas salgadas e salobras (INE, 2015).

Um potencial problema deste tipo de cultura é o desenvolvimento de infeções causadas por patógenos microbianos, incluindo bactérias multirresistentes, que são facilmente transmitidas pela água, podendo contaminar uma grande variedade de peixes (Flegel, 2006). Torna-se necessário o desenvolvimento de métodos para o controlo destes patógenos, que podem representar uma ameaça à saúde humana e/ou à produção da cultura em causa. Esta tese vai focar-se essencialmente nos patogénicos de peixes que podem causar grandes prejuízos à produção em aquacultura. A utilização de técnicas moleculares tem sido mencionada como alternativa viável para detetar e diagnosticar surtos de doenças, prevenindo perdas das culturas (Cassell & Mekalanos, 2001).

As bactérias *gram*-negativas são tipicamente os principais microrganismos patogénicos para as espécies de peixe. Estas bactérias possuem parede celular com camadas complexas (membrana externa e camadas lipoproteica lipopolissacarídea), que lhes garante proteção contra alguns antibióticos, usados em aquacultura, permitindo a sua sobrevivência (Cassell & Mekalanos, 2001). Bactérias dos géneros *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*,

Flavobacterium, *Mycobacterium*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* e *Vibrio* (Lewbart, 2001), são particularmente patogênicas para as espécies de peixe. Para além da perda das culturas e dos prejuízos associados, alguns patogênicos podem também permanecer na pele e intestino dos peixes e assim representar risco também para o consumidor.

As infeções por *Aeromonas* são de ocorrência mundial e são provavelmente a doença bacteriana mais comum em peixes de água doce (Noga, 1996). Este género é um dos principais causadores de perdas na aquacultura constituindo assim um grupo de especial relevo (Peixoto, Sá, Gordiano, & Costa, 2012). Várias publicações consideram estes patógenos oportunistas e descrevem mecanismos altamente específicos de infeção e prosperação de doença (Sha et al., 2005; Vilches et al., 2004; Yu et al., 2005).

Outra preocupação associada a *Aeromonas* tem a ver com a elevada resistência deste género a antibióticos (Gastalho, Silva, & Ramos, 2014). Existe um vário número de genes de resistência a antibióticos em *Aeromonas* spp. que podem ser transferidos para outras bactérias no ambiente de aquacultura (Jacobs & Chenia, 2007). O primeiro relatório sobre resistência antibacteriana adquirida em trutas indicou que a resistência a antibióticos observada em aquacultura de trutas tratadas com sulfatiazol e tetraciclina estava associada à infeção por *Aeromonas salmonicida* (Gastalho et al., 2014). Também por esta razão, estes microrganismos têm recebido grande atenção por parte da comunidade científica e serão alvo de estudo neste trabalho.

1.2 *Aeromonas*

1.2.1 O género

Apenas 4 espécies de *Aeromonas* foram primeiramente descritas: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* e *Aeromonas salmonicida* (Ghenghesh, Ahmed, El-Khalek, Al-Gendy, & Klena, 2008). O género evoluiu com o aparecimento de novas espécies inicialmente colocadas na família *Vibrionaceae*. Estudos genéticos concluíram que deveriam ser colocadas numa família própria, a *Aeromonadaceae* (Ghenghesh et al., 2008).

Desde a criação do género que este pode ser dividido em dois maiores grupos, baseados nas características de crescimento e em características bioquímicas (Janda & Abbott, 2010). O grupo das mesófilas, com temperatura ótima de crescimento entre 35° e 37°C, e o grupo das psicrófilas com temperaturas de 22° a 25°C (Janda & Abbott, 2010).

Nos últimos anos ocorreu uma expansão do género devido a uma maior facilidade de determinar sequências completas do gene de RNA ribossomal (rRNA) 16S (Janda & Abbott, 2010). No entanto, a proposta de criação de algumas espécies de *Aeromonas* recentemente descritas, baseia-se na análise de um pequeno número de estirpes (em alguns casos inferior a 3 estirpes), como é o caso de *Aeromonas molluscorum*, *Aeromonas aquariorum* e *Aeromonas tecta*; o que leva a alguns autores a questionarem a validade da criação destas novas espécies (Christensen et al., 2001; Janda & Abbott, 2010). De facto, existem casos em que estirpes de *Aeromonas* não podem ser atribuídas a uma espécie. Este é o caso de um estudo por RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) ao gene de rRNA 16S (Alperi, Figueras, Inza, & Martínez-Murcia, 2008), que conclui que há espécies muito idênticas e por vezes torna-se difícil a identificação e/ou atribuição de uma determinada estirpe a uma espécie em particular. Por exemplo *Aeromonas caviae* e *Aeromonas trota* estão relacionadas apenas a 30% a nível de homologia por DNA (ácido desoxirribonucleico), mas as suas sequências de 16S rRNA diferem em apenas 3 ou menos nucleótidos (Morandi et al., 2005). Outro caso é o de *Aeromonas sobria* e *Aeromonas veronii* que estão relacionadas 65% por homologia de DNA, no entanto, diferem em 14 nucleóticos nas suas sequências 16S (Janda & Abbott, 2010). Por estas razões, torna-se por vezes muito difícil a distinção a nível de espécies de *Aeromonas*.

Aeromonas são Gram-negativas, em forma de bastonete, anaeróbicas facultativas, amplamente distribuídas em ambientes aquáticos (Daskalov, 2006). A maioria das espécies apresentam motilidade por meio de flagelos, com a exceção de *Aeromonas caviae* e algumas *A. salmonicida*. A sua temperatura de crescimento ótima é normalmente de 30°C e a sua motilidade vai desde os 0 a 45°C para algumas espécies, mas com temperatura ótima dos 22 aos 35°C. O pH ótimo de crescimento é o alcalino, pelo que esta característica é usada como fator de seleção no passo de enriquecimento para isolamento desta bactéria em algumas amostras (Ghenghesh et al., 2008).

Podem ser facilmente distinguidas de outras bactérias pela sua incapacidade de crescer na presença de cloreto de sódio 6.5%, incapacidade de fermentar inositol e capacidade da maioria das espécies de fermentar D-manitol e sacarose (Igbiosa, Igumbor, Aghdasi, Tom, & Okoh, 2012). Produzem ácido a partir de hidratos de carbono distintos, especialmente a partir de D-glucose. Usualmente são oxidase e catalase positivas, reduzem nitratos a nitritos e sintetizam numerosas enzimas hidrolíticas que estão envolvidas em processos patogénicos (Janda & Abbott, 2010).

1.2.2 Virulência

As espécies de *Aeromonas* produzem enzimas extracelulares que contribuem para a patogênese ajudando na capacidade de infecção e invasão (Carvalho, Martínez-Murcia, Esteves, Correia, & Saavedra, 2012). Alguns exemplos deste tipo de enzimas incluem amilase, quitinases, elastases, aerolisina, nuclease, gelatinase, lecitinase, lipase e protease (Peixoto et al., 2012).

Entrando na célula hospedeira há também a produção de sideróforos, moléculas que permitem à bactéria captar o ferro dissolvido no ambiente tornando-o indisponível ao hospedeiro (Ali & Vidhale, 2013); e proteínas de membrana que ajudam na sua infecção (Peixoto et al., 2012).

Um dos parâmetros também envolvido nos processo de virulência desta bactéria é a temperatura do ambiente. Num estudo com *A. hydrophila* verificou-se que quando isolada do meio ambiente, esta espécie produzia mais toxinas a uma temperatura de 28°C, enquanto um isolado clínico produzia mais toxinas a 37°C (Mateos, Anguita, Naharro, & Paniagua, 1993). Isto evidencia uma elevada plasticidade metabólica que permite à bactéria adaptar-se a diferentes nichos.

Outros fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade deste género incluem genes que codificam para toxinas e um tipo de sistema de secreção III que também liberta toxinas diretamente nas células hospedeiras, induzindo a apoptose (Buller, 2014; Reith et al., 2008). Produzem um vasto leque de toxinas tais como a enterotoxina citotóxica, hemolisinas e um inibidor do canal de sódio semelhante à tetrodoxina (Varman & Evans, 1991)

Altas resistências a antibióticos β -lactâmicos, tais como penicilinas e cefalosporinas, estão associadas à produção de β -lactamases em *Aeromonas* (Carvalho et al., 2012). Genes que codificam resistência a β -lactâmicos, os genes *bla*, foram encontrados também em isolados de *Aeromonas* de ambientes aquáticos e de animais de aquacultura demonstrando a capacidade deste género em adquirir genes de resistência (Carvalho et al., 2012).

1.2.3 Patogenicidade

Maioritariamente o género *Aeromonas* causa doença em peixes e tem emergindo como importantes patogénicos em aquaculturas. No entanto, pode causar também doenças ao homem,

sendo a água e os peixes a fonte potencial de transmissão (Daskalov, 2006; Lehane & Rawlin, 2000). A infecção está associada a doenças gastrointestinais, nomeadamente em crianças, idosos e pacientes imunodeprimidos que sofrem de doenças como cancro ou diabetes (Khajanchi et al., 2010).

Os sinais clínicos de infecção por *Aeromonas* em peixes podem variar de lesões na pele a quadros típicos de septicemia. Quanto a lesões de pele, podem-se apresentar como hemorragia e necrose, podendo progredir para úlceras. Em quadros de infecção sistémica é observado exoftalmia (acumulo de líquido na cavidade ocular produzindo edema), abdómen distendido e presença de petéquias hemorrágicas nas vísceras (Figueiredo & Leal, 2008).

Dois maiores grupos que causam doença a peixes são conhecidos: *A. salmonicida*, que causa furunculose maioritariamente aos salmonídeos (Figura 1.1), e o grupo das espécies mesófilas (especialmente *A. hydrophila* e *A. veronii*) causando septicemia (Figura 1.2). Estas espécies mesófilas, principalmente *A. Hydrophila*, têm sido associadas a grande mortalidade em peixes por todo o mundo, resultando em grandes perdas económicas (Janda & Abbott, 2010; Joseph & Carnahan, 1994).



Figura 1.1- Furúnculo na superfície de uma truta arco-íris (Austin & Austin, 2012)



Figura 1.2- Hemorragia á superfície de uma carpa (Austin & Austin, 2012)

No entanto são várias as espécies deste género que têm estado relacionadas com doenças em peixes. Um pequeno sumário das espécies de *Aeromonas* atualmente descritas e do seu potencial patogénico em peixes ou humanos é apresentado na tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Patogenicidade das espécies de *Aeromonas*. A informação recolhida nesta tabela foi baseada nas seguintes referências bibliográficas: (Austin & Austin, 2012; Buller, 2014).

Espécies	Patogénica para peixes	Patogénica para humanos	Não patogénica
<i>Aeromonas allosaccharophila</i>	×		
<i>Aeromonas aquariorum</i>			×
<i>Aeromonas bestiarum</i>	×		

nomeadamente rins e fígado (Austin & Austin, 2012). *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* é um agente patogénico para muitos peixes ornamentais, tilápia, truta, enguia, salmão do atlântico e camarões (Buller, 2014; Dierckens et al., 1998). Produz uma grande quantidade de toxinas, incluindo hemolisinas, citotoxinas, enterotoxinas e aerolisina, sendo que a aerolisina é a principal a contribuir para a patogenicidade (Chopra, Houston, Peterson, & Jin, 1993). No peixe brage-americano (*Ictalurus punctatus*), cultivado nos estados unidos, pode apresentar-se de forma septicémica com necrose nos órgãos internos ou como infeção da pele apresentando lesões cutâneas (Ventura & Grizzle, 1988). Em camarões do tipo fada (*Branchipus schaefferi*) causa a chamada doença negra, caracterizada por nódulos pretos nos apêndices torácicos (Dierckens et al., 1998).

Já a espécie *Aeromonas allosaccharophila* foi originalmente isolada de enguias doentes o que sugeriu um papel patogénico. No entanto, ainda não esta totalmente comprovada a sua patogenicidade em peixes (Martinez-Murcia, Esteve, Garay, & Collins, 1992).

Aeromonas bestiarum foi inicialmente classificada como *A. hydrophila* e é evidente a sua patogenicidade em peixe, causando-lhes úlceras, hemorragias e necrose (Kozínska, Figueras, Chacon, & Soler, 2002; Orozova, Barker, Austin, & Austin, 2009).

Aeromonas caviae tem sido associada a doença ocular e septicemia hemorrágica em peixes de água doce, salmão do atlântico, polvo, camarão e em truta arco-íris (Ogara et al., 1998; Sung, Hwang, & Tasi, 2000). A inoculação desta espécie à concentração de $3,8 \times 10^6$ células/g em uma espécie de camarão de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*) resultou em morte (Sung et al., 2000).

Já relativamente à espécie *Aeromonas jandaei*, esta mostrou ser um agente patogénico primário para enguias Europeias (*Anguilla anguilla*) (Esteve, Biosca, & Amaro, 1993). A maioria das espécies produz elastases, que é considerado um fator de virulência das espécies de *Aeromonas* (Esteve, Valera, Gutiérrez, & Ventosa, 2003).

Isolados identificados como *Aeromonas sobria* biovar *sobria* foram relatados como patogénicos para a truta arco-íris (Orozova et al., 2009). As trutas mortas revelaram presença de septicemia hemorrágica. *A. veronii* biovar *sobria* foi recuperada de peixes apresentando grandes úlceras caracterizadas pela síndrome ulcerativa levando à morte (Rahman et al., 2002). Experiências de laboratório revelaram também o seu potencial patogénico em salmão do atlântico contaminado com 10^7 células /ml, que resultou em necrose muscular (Austin & Austin, 2012). *Aeromonas salmonicida* causa furunculose, septicemia e doenças ulcerativa e hemorrágica (Igbinosa et al., 2012). *A. salmonicida* infeta maioritariamente o peixe salmão, mas a variedade de peixes que pode infetar é enorme. É conhecida como o agente que causa a furunculose mas

dependendo das condições também pode causar dermatite ulcerativa em vários tipos de peixe (Cipriano & Bullock, 2001; Rocklebank, 1998) . Para além do salmão, tem sido relatada em peixes como truta, truta arco-íris, enguias e lampreia do mar de países como Alemanha, Áustria, Finlândia, França, Portugal, Suíça, Reino Unido e Estados Unidos da América (Cipriano & Bullock, 2001; Faisal, 2006; Hirvelä-koski, Koski, & Niiranen, 1994; Sousa, Romalde, Eiras, & March, 1997).

Existem estirpes de *A. salmonicida* atípicas em que a sua patogenicidade mostra grande variabilidade, com diferentes mecanismos de virulência das típicas *A. salmonicida*. Infetam também uma grande variedade de peixes geralmente através de úlceras cutâneas sem septicemia como é o caso no peixe goldfish (Shotts, Talkington, Elliott, & McCarthy, 1980). As estirpes atípicas isoladas do goldfish mostraram ser altamente virulentas para salmão do atlântico, truta e truta arco-íris.

1.3 Métodos de deteção

Testes bioquímicos foram já utilizados para identificação de *Aeromonas*, mas uma diferenciação clara entre algumas espécies era, e continua a ser, bastante difícil (Janda, Abbott, Khashe, Kellogg, & Shimada, 1996). Apesar de tais discrepâncias, vários estudos permitiram melhorar a identificação das espécies e estudos de hibridação de DNA permitiram uma melhor diferenciação.

O género *Aeromonas* em geral é de difícil identificação pois existe uma grande variedade de características bioquímicas dos elementos deste género. Existe por vezes uma falta de concordância entre os testes bioquímicos e os genéticos, que se baseiam no facto de a identificação bioquímica já existente não permitir uma distinção adequada das espécies (Ørmen, Granum, Lassen, & Figueras, 2005).

Existe, portanto, uma falta de métodos rápidos e eficientes na deteção da contaminação por *Aeromonas* e de facto, tendo em conta a variabilidade de espécies e do seu potencial patogénico, não é ainda clara a necessidade e vantagem da deteção das espécies em procedimentos de rotina.

1.3.1 Métodos de deteção baseados em cultura

Um grande número de meios de isolamento seletivos e diferenciais têm sido desenvolvidos para detetar *Aeromonas* de amostras de ambiente, amostras clínicas e alimentos (Villari, Pucino, Santagata, & Torre, 1999).

Existe um método desenvolvido para detecção e enumeração de *Aeromonas* em amostras de água. Utiliza um meio seletivo que inibe espécies não-*Aeromonas*, permitindo o crescimento de espécies *Aeromonas* (States, 2001). O método descreve um procedimento de filtração através de uma membrana para detecção e enumeração de *Aeromonas*. A amostra de água é filtrada através de uma membrana de 0.45 µm de poro. O filtro é colocado no meio ampicilina dextrina agar com vancomicina e incubado a 35°C ± 0.5°C por 24 horas. Este meio usa ampicilina e vancomicina para inibir as espécies não-*Aeromonas*, enquanto favorece o crescimento de espécies de *Aeromonas*. Estas são identificadas pela produção de ácido pela fermentação de dextrina, ocorrendo o aparecimento de colônias amarelas no meio agar ampicilina dextrina com vancomicina (ADA-V). As colônias são posteriormente confirmadas pelo teste de oxidase, pela fermentação de trealose e produção de índole (States, 2001).

Existem da mesma forma métodos de cultura para identificação de *Aeromonas* em alimentos. Os meios Agar amido ampicilina e meio *Aeromonas* (Ryan) são recomendados (Igbinosa et al., 2012). Geralmente, em ambos os meios é aconselhada a adição de ampicilina, favorecendo o crescimento de espécies *Aeromonas*, em detrimento de outras espécies presentes na microflora. A utilização destes meios é normalmente precedida de um enriquecimento em água peptonada alcalina (APW) (Igbinosa et al., 2012). APW é um meio rico utilizado muito frequentemente para o enriquecimento de amostras de alimentos para detecção de agentes patogênicos com preferência por pH básico.

1.3.2 Métodos de detecção molecular

Relativamente a métodos de detecção molecular, têm sido desenvolvidos métodos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em uma variedade de tipos de amostras. Este método envolve um procedimento de amplificação de segmentos específicos de DNA. Consiste em desnaturar uma molécula de DNA de cadeia dupla, por calor, para posteriormente, ao baixar a temperatura, haver uma ligação específica (*annealing*) de um oligonucleótido (normalmente chamado de *primer*), complementando a região 5' do segmento a amplificar. Posteriormente, por ação de uma enzima, a Taq polimerase, é sintetizada uma nova cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples.

Existe um método de PCR descrito que deteta o gene que codifica para a aerolisina de *Aeromonas*. Testes em fezes mostraram que este método foi capaz de detetar *Aeromonas* em

68% das amostras comparando com 64% detetadas por métodos convencionais utilizando meios seletivos (Kannan, Suresh Kanna, Karkuzhali, Chattopadhyay, & Pal, 2001).

Também em 2002 foi desenvolvido um ensaio de PCR para detecção do gênero, que se baseava nos genes *hlyA* (codifica para hemolisina) e *aerA* (codifica para aerolisina) que contribuem para a virulência da bactéria (González-Rodríguez, Santos, Otero, & García-López, 2002).

Em 2006, foi feito um estudo em que compararam ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), um teste imunoenzimático que permite a detecção de antígenos específicos expressos na parede celular da bactéria; e PCR quanto à capacidade de detetar *Aeromonas* em amostras alimentares. Para o PCR usaram também primers para o gene da aerolisina e do rRNA 16S. A eficiência dos métodos foi avaliada com inoculação de diferentes concentrações celulares em amostras de frango e leite, seguindo-se o enriquecimento em água peptonada alcalina, mas com adição de cefalotina (APW-C). A adição deste antibiótico permite uma melhor recuperação de *Aeromonas*. O método de PCR mostrou-se capaz de detetar células em concentrações mais baixas (1cel/ml) relativamente ao de ELISA (10^3 cel/ml) (Arora, Agarwal, & Bist, 2006).

Em 2007 Porteen *et al.* desenvolveu o método de PCR para detecção de *Aeromonas* spp. em amostras de frango e peixe, usando também primers para o gene 16S rRNA e para o gene da aerolisina (Porteen, Agarwal, & Bhilegaonkar, 2007). O meio de enriquecimento utilizado foi também o APW-C. Com o estudo concluíram que a utilização do gene 16S como alvo fornece melhores resultados de detecção que o gene de aerolisina (Porteen *et al.*, 2007). Os primers usados mostraram ser altamente específicos para *Aeromonas* sp. e não mostraram resultado positivo com outras bactérias.

Balakrishna *et. al* desenvolveu um multiplex de PCR, que utiliza o PCR para amplificar varias sequencias diferentes simultaneamente, para detecção dos genes de virulência, incluindo a hemolisina (*hlyA*), aerolisina (*aerA*), juntamente com o gene rRNA 16S. O método mostrou ser eficaz na detecção a partir de alimentos, apresentando vantagens quanto à especificidade e sensibilidade relativamente a outros métodos PCR já desenvolvidos, ou mesmo a métodos de hibridação por DNA (Balakrishna, Murali, & Batra, 2010).

Já relativamente a técnicas de análise de filogenia deste gênero, além das técnicas de sequenciação do gene 16S rRNA e técnicas de hibridação DNA-DNA, a sequenciação do gene *gyrB* tem sido proposto como um marcador molecular para a identificação de espécies bacterianas (Yamamoto & Harayama, 1998). Foi através da análise da sequencia do gene *gyrB*

que foi construída a árvore filogenética de *Aeromonas* (Pidiyar et al., 2003). Yanez et al. (Yáñez, Catalán, Apráiz, Figueras, & Martínez-Murcia, 2003) demonstraram que o gene *gyrB* está de acordo com os dados do rRNA 16S que levaram à colocação do género *Aeromonas* na família *Aeromonadaceae* e em que o gene *gyrB* pode ajudar a dissipar dúvidas decorrentes da sequenciação do gene de rRNA 16S e resultados de hibridação DNA-DNA.

1.4 FISH

Fluorescence in situ hybridization (FISH) é uma técnica molecular que permite a detecção *in situ* de sequências específicas através de sondas de ácidos nucleicos que são marcadas com um fluorocromo (Amann & Fuchs, 2008). Tipicamente o rRNA é usado como o alvo das sondas oligonucleótidas. No caso das bactérias, as subunidades 16S e 23S do rRNA são as mais usadas como sequências alvo (Bottari, Ercolini, Gatti, & Neviani, 2006). Estas regiões são muito utilizadas porque estão presente em todas as células; apresentam elevado número de cópias por célula, o que proporciona um elevado sinal; existem muitas sequências conhecidas e depositadas em bases de dados; e são compostas por regiões de elevada conservação (Amann & Ludwig, 2000).

A técnica de FISH envolve 5 passos principais: fixação, permeabilização, hibridação, lavagem e visualização. A fixação das células, através da utilização de reagentes químicos, permite estabilizar a sua morfologia celular e permeabilizar a membrana facilitando a entrada da sonda. De seguida a hibridação utiliza uma sonda com uma sequência conservada marcada por fluorescência que é complementar à sequência de interesse (Robertson & Thach, 2009). O passo de lavagem assegura que todo o excesso de sonda é lavado (Cerqueira et al., 2008). Por último a visualização, que pode ser realizada por citometria de fluxo ou por microscópio de fluorescência, verifica se ocorreu hibridação com sucesso (Sílvia Fontenete, Guimarães, Wengel, & Azevedo, 2015).

É um método altamente sensível e específico em que o seu sucesso depende das sequências de oligonucleótidos (sondas) que devem hibridar com sequências complementares e não hibridar com sequências que contêm um ou mais *mismatches*; isto é, sequências que apresentam variações face à sequência alvo perfeita (Silvia Fontenete et al., 2015).

Alguns autores desenvolveram sondas de DNA específicas para a detecção de algumas espécies de *Aeromonas*, nomeadamente para a detecção das espécies *Aeromonas popoffi*, *A. salmonicida* e *A. hydrophila*. (Demarta, Tonolla, Caminada, Ruggeri, & Peduzzi, 1999; Hiney

et al., 1992; Oakey, Ellis, & Gibson, 1998). Para *Aeromonas* spp. parece ainda não haver sondas descritas na literatura.

Adicionalmente, as sondas descritas são exclusivamente de DNA o que tipicamente limita a performance dos métodos de FISH, devido a problemas de afinidade e robustez associadas ao uso deste tipo de sondas.

1.4.1 LNA-FISH

As sondas de DNA são usualmente utilizadas em FISH, no entanto o uso de mímicos de ácidos nucleicos, tais como os ácidos nucleicos bloqueados (LNA) ou ácido nucleico peptídico (PNA), têm sido utilizadas na melhoria do desempenho das técnicas de FISH (Silvia Fontenete et al., 2015).

A utilização de mímicos de ácidos nucleicos como sondas em FISH está a tornar-se uma ferramenta molecular emergente para a deteção de microrganismos (Silahtaroglu et al., 2003). As sondas que contém esses mímicos de ácidos nucleicos têm o potencial de ultrapassar algumas limitações associadas às técnicas de FISH tradicionais, tais como, baixa afinidade e especificidade da hibridação (Robertson & Thach, 2009).

O LNA (figura 1.3) representa uma nova classe de análogos de oligonucleótidos em que o anel da ribose está restringido por uma ligação de metileno entre 2-O e o 4-C (Koshkin et al., 1998; Robertson & Thach, 2009; Silahtaroglu et al., 2003). As sondas modificadas com nucleótidos de LNA têm vindo a ser utilizadas e têm fornecido alta eficiência de hibridação, melhorando o desempenho do método (Sílvia Fontenete et al., 2016; Kubota, Ohashi, Imachi, & Harada, 2006; Priya, Pandey, & Rajagopal, 2012; Robertson & Vora, 2012). Estas sondas podem ainda ser desenhadas junto com monómeros de DNA ou outros tipos de modificações químicas, tais como RNA 2'-O-methyl (Sílvia Fontenete et al., 2016). Isto permite uma maior versatilidade no desenho e um maior controlo dos parâmetros termodinâmicos.

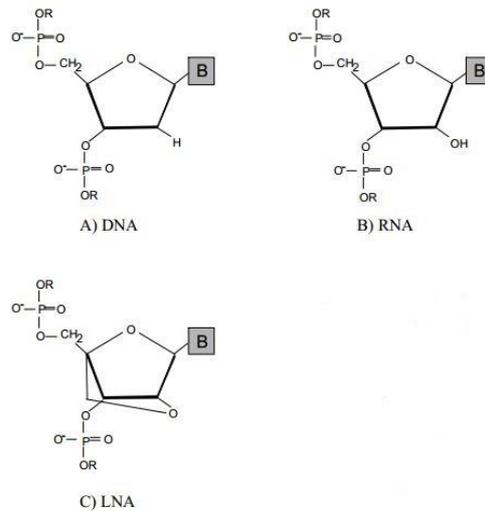


Figura 1.3 - Estruturas Químicas de DNA, RNA e LNA
(Cerqueira et al., 2008)

Existem estudos que demonstram que sondas de oligonucleótidos LNA/DNA são sondas muito eficientes originando sinais fortes de hibridação, altas especificidades e aumentam a discriminação das sequências que contêm *mismatches* (Kubota et al., 2006; Silaharoglu et al., 2003) . A utilização de uma densidade elevada de resíduos de LNA é um parâmetro importante para melhorar a discriminação por *mismatches* (Silvia Fontenete et al., 2015). Comparando sondas de LNA com sondas de DNA, as de LNA mostraram melhorar significativamente a sensibilidade e especificidade da técnica FISH (Kubota et al., 2006; Robertson & Thach, 2009; Silaharoglu et al., 2003; Válóczy et al., 2004) .

As sondas de LNA são também muito solúveis em água e verificou-se hibridarem mais eficazmente com DNA ou RNA que as sondas de PNA, sendo para algumas aplicações mais vantajoso o seu uso (Braasch & Corey, 2001; Elayadi, Braasch, & Corey, 2002; Robertson & Thach, 2009).

O desenho destas sondas obedece às mesmas regras que qualquer outra sonda de FISH, que geralmente envolve: a procura de regiões conservadas entre sequências da estirpe alvo, posteriormente confrontando-as com bases de dados disponíveis online; análise da sua sensibilidade e especificidade e também uma análise relativa a ocorrência/posição de *mismatches*. Posteriormente é realizada uma adaptação da molécula ao mimico em questão de forma a melhorar as propriedades termodinâmicas da molécula, tais como a percentagem em GC, Tm e energia livre de ligação.

No entanto, por vezes torna-se difícil a otimização dos procedimentos em FISH, pois é altamente imprevisível as condições de hibridação de cada tipo de sonda, dado que, existem diversos fatores que podem afetar a sua eficiência. Pode ser necessário um conhecimento das

relações entre parâmetros e do seu efeito na hibridação e, conseqüentemente, no sinal de fluorescência.

1.5 RSM

Response surface methodology (RSM) é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas úteis para desenvolver, melhorar e otimizar processos. A otimização é particularmente útil quando se pretende estudar variáveis independentes e os seus níveis de resposta ainda não são conhecidos (Ahmad & Alrozi, 2010). Oferece uma grande quantidade de informação a partir de um pequeno grupo de experiências. Analisa o efeito de variáveis independentes e gera um modelo matemático (Anderson-Cook, Borror, & Montgomery, 2009; Baş et al., 2007).

O padrão de RSM chamado de *central composite design* (CCD) é usado para criar o modelo e visualizar a interação das variáveis bem como otimizar determinados parâmetros com um número mínimo de experiências (Xin-hui, Srinivasakannan, Jin-hui, Li-bo, & Zheng-yong, 2011).

O desenho das experiências tem como objetivo otimizar a resposta (variável de saída) que é influenciada por diversas variáveis independentes (variáveis de entrada). É gerado uma série de testes, chamadas de corridas, em que são feitas alterações nas variáveis de entrada como objetivo de identificar razões para mudanças na resposta de saída (Gunst, 1996).

Existem alguns passos na aplicação deste método que devem ser seguidos para uma otimização eficiente: 1) seleção das variáveis independentes de maior efeito no sistema em estudo e delimitação da região experimental de acordo com o objetivo do estudo definindo os níveis dos parâmetros; 2) escolha do desenho experimental e a execução das experiências de acordo com a matriz experimental selecionada; 3) a avaliação do modelo; 4) a verificação da necessidade de realizar um deslocamento na direção de uma região ótima e então obter os valores ótimos para cada variável em estudo (Baş et al., 2007; Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar, & Escaleira, 2008). A resposta pode ser representada graficamente, o que ajuda a visualizar a forma da superfície de resposta.

Na avaliação do modelo ajustado aplica-se a análise de variância (ANOVA). A ideia da sua aplicação é comparar a variação devida à experiência (alteração na combinação dos níveis das variáveis) com a variação devida a erros aleatórios inerentes às medidas das respostas geradas (Bezerra et al., 2008).

Este método apresenta varias vantagens em comparação com outros métodos experimentais de otimização: oferece uma grande quantidade de informação a partir de um pequeno número de experiências e é um método menos demorado relativamente aos métodos clássicos de otimização. Também oferece a possibilidade de observar o efeito de interação dos parâmetros independentes relativamente a uma resposta (Baş et al., 2007).

Sondas universais de bactérias tais como a EUB338 são frequentemente utilizadas em estudos de otimização com diferentes bactérias e também usadas como sondas controlo para estudos com sondas específicas para um tipo de bactéria (Santos, Guimarães, Madureira, & Azevedo, 2014). Uma sonda universal é um bom modelo para compreender a ação de variáveis utilizadas em FISH na otimização da deteção em diferentes bactérias, sem que haja a influência do desenho da sonda e afinidade para o seu alvo.

1.6 Objetivos

Neste projeto irá ser desenvolvida uma sonda de LNA específica para o género *Aeromonas* para posterior aplicação num procedimento FISH para deteção em alimentos.

O trabalho desenvolvido está organizado em 4 capítulos: introdução, desenho da sonda, a sua otimização experimental e a conclusão. O presente capítulo é uma introdução geral em que contextualiza o domínio do trabalho, fazendo uma revisão sobre o género *Aeromonas* e o seu potencial patogénico em peixes e os métodos descritos para sua deteção. Também são descritas as características e vantagens para a deteção através do método LNA-FISH.

No capítulo do desenho da sonda está contida toda a informação relevante da construção da sonda, descrevendo e analisando todas as etapas. No capítulo seguinte encontra-se toda a informação relativa à validação experimental da sonda, tal como a descrição dos métodos de otimização das condições de hibridação da sonda. É também feita uma otimização por RSM a fim de compreender o efeito de três variáveis usadas no passo de hibridação.

No último capítulo são descritas as conclusões deste trabalho bem como algumas sugestões para trabalho futuro.

2. DESENHO DA SONDA

2.1 Primrose

Para o desenho da sonda para a detecção de *Aeromonas* utilizou-se o programa Primrose e a base de dados de RNAr 16S disponível no sitio da *Ribossomal Database Project* (RDP II). Os critérios para a seleção da sonda incluíram: um elevado número de espécies de *Aeromonas* detetadas bem como um baixo número de outros microrganismos que não *Aeromonas* detetadas; uma percentagem de GC entre 50-60%; uma temperatura de melting superior a 50°C. O Primrose é um programa que através de uma base de dados e da seleção de sequências-alvo, identifica potenciais oligonucleótidos que servirão de sondas para ensaios de FISH (Ashelford, Weightman, & Fry, 2002).

A etapa inicial é a construção da base de dados (Figura 2.1). Carregam-se as sequências referentes a procariontes, que contêm os domínios Archaea e Bacteria. Para a base de dados ficar mais completa carregaram-se em paralelo 2084 sequências referentes a todas as estirpes de *Aeromonas* spp. que fazem parte da base de dados do RDP II.

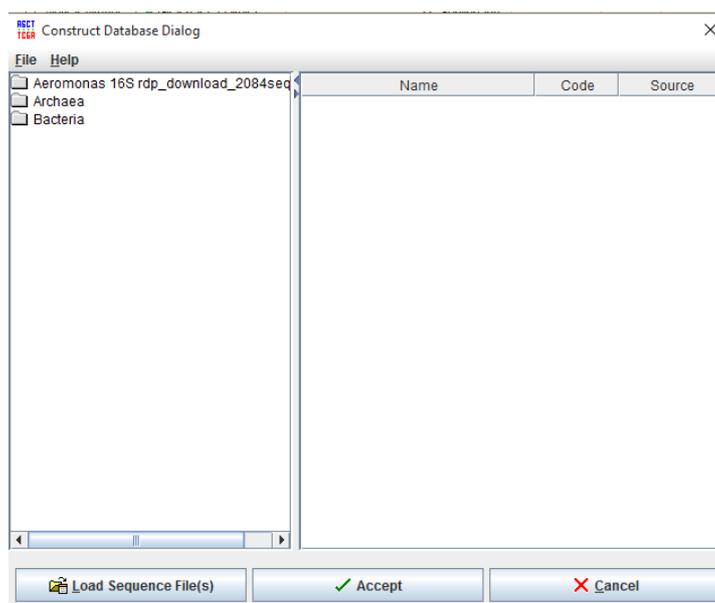


Figura 2.1 - Construção da base de dados

No segundo passo, selecionam-se as sequências-alvo para a construção da sonda, no item “Specify Target Taxon” presente no programa, ou seja, selecionam-se todas as sequências presentes nas bases de dados carregadas pertencentes ao género *Aeromonas*. Seleciona-se as espécies na base de dados “Aeromonas 16S rpd _download_2084seq.fas” e na pasta de base de dados Bacteria seguindo os seguintes passos para encontrar as sequências-alvo: Proteobacteria; Gamma subdivision; *Aeromonas* Group (Figura 2.2).

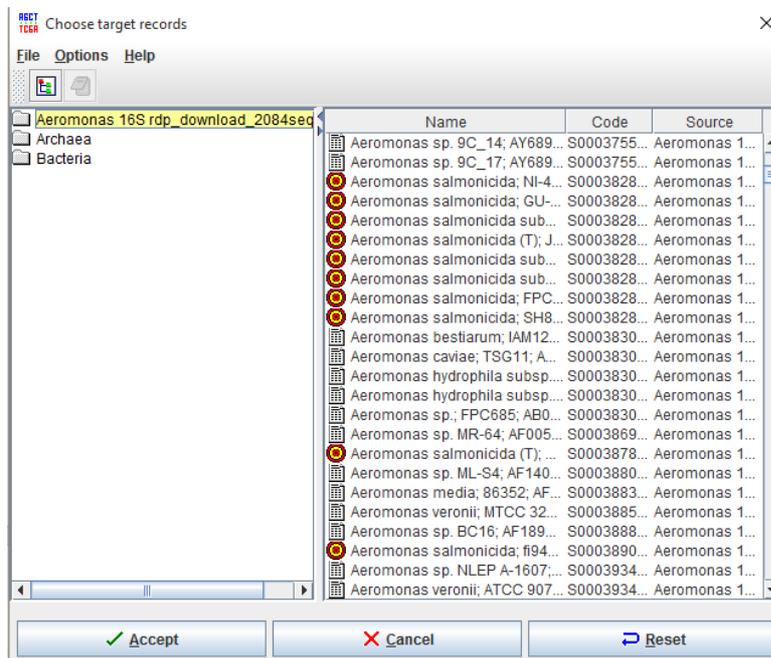


Figura 2.2- Seleção das sequências alvo

Na terceira etapa há uma procura de regiões conservadas nas sequências alvo e, consequentemente, de oligonucleótidos complementares às mesmas. O comprimento dos oligonucleótidos selecionado é de 15 pares de bases e o máximo de bases degeneradas é de zero, para ocorrer uma hibridação perfeita. Uma vez que se selecionam bastantes sequências alvo no passo anterior, é necessário escolher um conjunto menor de estirpes de referência no campo “Design Form?” (Figura 2.3) para a procura das regiões conservadas. Quando o programa procura regiões conservadas vai ter em conta este subgrupo, mas, posteriormente, a avaliação de potenciais oligonucleótidos, vai ter em conta o grupo selecionado como alvo.

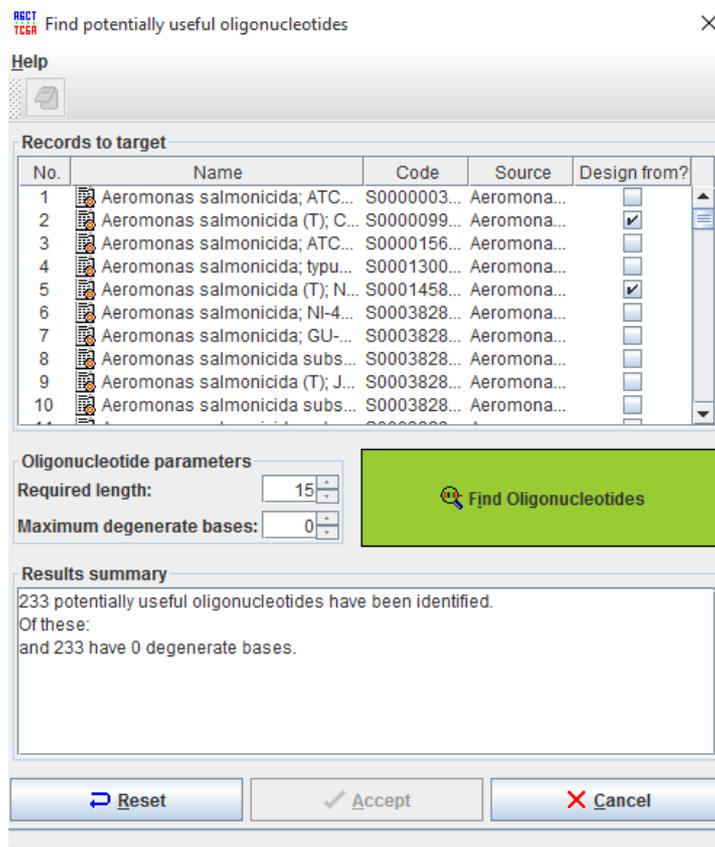


Figura 2.3- Procura de potenciais oligonucleótidos

O último item do programa “Check Oligonucleotides Against Database” procura um conjunto de potenciais sequências que detetem sequências-alvo, mas que não detetem sequências não-alvo (figura 2.4).

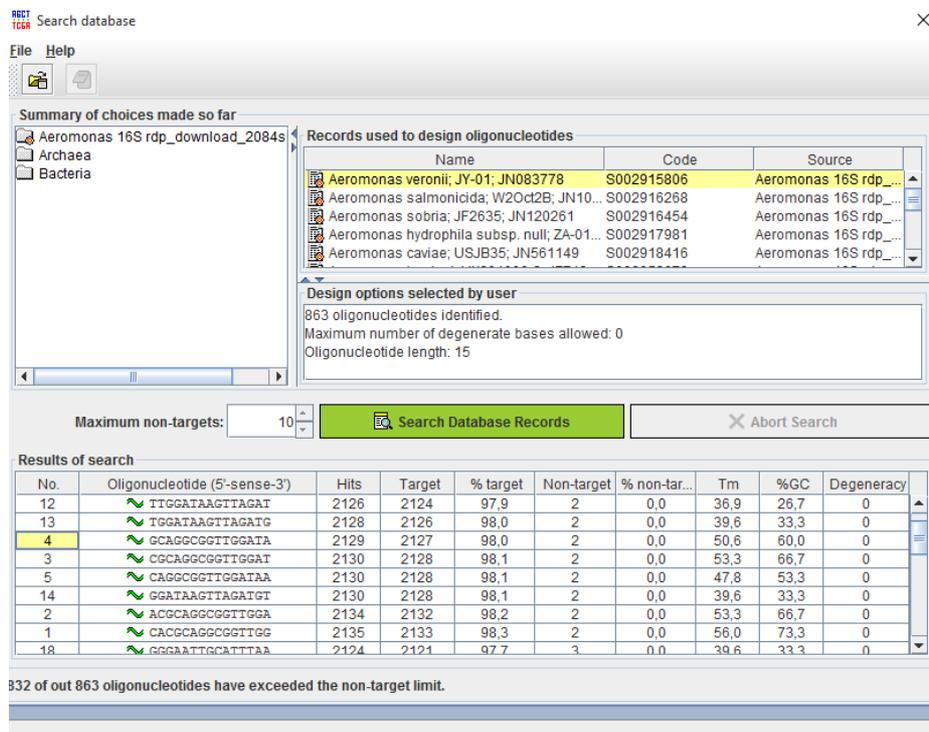


Figura 2.4- Comparação dos oligonucleótidos selecionados para *Aeromonas* spp. com a base de dados 16S

O programa apresentou um conjunto de oligonucleótidos que dizem respeito a sequências conservadas. Desse conjunto apenas se selecionou 5 sequências com uma performance aceitável de parâmetros (sequências número 1 a 5). Além disso foi tido também em conta o número de non-target selecionando. Só as sequências que possuíam 2 não-target foram consideradas (Figura 2.4).

2.2 Probe match

Para melhor complementar os resultados obtidos com o programa PrimRose, as potenciais sequências de interesse foram depois analisadas com mais detalhe com recurso à ferramenta Probe Match (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>). Este programa permite correr as sequências nucleotídicas contra a base de dados RDP II (*Ribosomal Database Project* -

http://rdp.cme.msu.edu/hierarchy/hb_intro.jsp) online, cuja versão é sempre mais atual e completa que as disponíveis para download. Foram selecionadas 5 possíveis sequências, por conter maior número de sequências alvo; menor número de “non-targets”, percentagem adequada de guanina e citosina, e possuir uma temperatura de “melting” superior a 50°C (Tabela 1).

Tabela 2.1 – Oligonucleótidos detetados para o género *Aeromonas* e respetivas características.

Oligonucleótido	Sequência (5'-3')	Posição (rRNA 16S)	Nº <i>Aeromonas</i> detetadas	Nº não- <i>Aeromonas</i> detetadas	Tm (°C)	GC (%)
1	CACGCAGGCGGTTGG	577	2194*	36 [#]	67,82	73,3
2	ACGCAGGCGGTTGGA	578	2192*	6 [#]	67,03	66,7
3	CGCAGGCGGTTGGAT	579	2187*	7 [#]	66,06	66,7
4	GCAGGCGGTTGGATA	580	2188*	7 [#]	63,20	60
5	CAGGCGGTTGGATAA	581	2189*	7 [#]	61,37	53,3

*Estirpes de *Aeromonas* detetadas em 2223 *Aeromonas* presentes na Base de Dados.

[#]Estirpes não-*Aeromonas* detetadas num total de 252995 não-*Aeromonas* presentes na Base de Dados.

No programa “Probe match” introduziram-se as possíveis sequências na direção 5'-3' e efetuou-se a busca das sequências das potenciais sondas. Em “Data Set Options” escolheram-se as seguintes opções: “Both strain”; “Source Isolates”; “Size ≥ 1200 ” e “Good Quality”.

Segundo a base de dados do RDP II, as 5 sequências analisadas permitem a deteção da maioria das estirpes de *Aeromonas* presentes. Contudo das estirpes detetadas existem estirpes que pertencem a outras classes (Tabelas 2.2 a 2.5).

A primeira sonda analisada, permite detetar 2230 estirpes bacterianas. Destas estirpes, 2194 são *Aeromonas* spp. e as outras 36 pertencem a outras classes como mostra a Tabela 2.2. Não são *hits* relevantes pois nenhuma das espécies está descrita como patogénica para peixes, no entanto o número de *hits* não-*Aeromonas* é elevado e o objetivo é que o máximo de número de *hits* sejam *Aeromonas*.

Tabela 2.2- Estirpes não-*Aeromonas* detetadas pela sonda 1 .

Classe	Ordem	Família	Género	Espécie (nº de sequencias detetadas)
				<i>Kouleothrix aurantiaca</i> (5)
Chloroflexia	<i>Chloroflexales</i>	<i>Chloroflexaceae</i>	<i>Roseiflexus</i>	<i>green non-sulfur bacterium</i> (2)

				<i>Chloroflexi bacterium</i> (1)
Unclassified "Chloroflexi"				<i>Chloroflexi bacterium</i> (1)
Gammaproteobacteria	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Tolomonas</i>	<i>bacterium H4</i> (1)
				<i>Tolomonas osonensis</i> (1)
				<i>Tolomonas auensis</i> (1)
				<i>Tolomonas spp.</i> (1)
	<i>Chromatiales</i>	<i>Chromatiaceae</i>	<i>Rheinheimera</i>	<i>Rheinheimera chironomi</i> (3)
				<i>Rheinheimera sp.</i> (7)
	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Cronobacter</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i> (5)
				<i>Cronobacter malonaticus</i> (1)
			<i>Morganella</i>	<i>Morganella morganii subsp. Null</i> (1)
				<i>bacterium YSS/2001-4</i> (1)
			<i>Providencia</i>	<i>Providencia rettgeri</i> (1)
			<i>unclassified_Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia marcescens</i> (1)
	<i>Pasteurellales</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>unclassified_Pasteurellaceae</i>	<i>Avibacterium gallinarum</i> (1)
<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>unclassified_Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas putida</i> (1)	
		<i>unclassified_Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas putida</i> (1)	

Já no caso das outras sondas analisadas a especificidade da sonda é superior, visto que o número de não targets é inferior, mas baixa também, ainda que muito ligeiramente, o número de *Aeromonas* detetadas. Por exemplo, para a sonda 2, são detetadas 2198 estirpes, das quais 2192 são *Aeromonas* spp. e as restantes 6 pertencem a outras classes relacionadas (Tabela 2.3).

Tabela 2.3- Estirpes não-*Aeromonas* detetadas pela sonda 2.

Classe	Ordem	Família	Género	Espécie
Gammaproteobacteria				<i>Bacterium H4</i> (1)
				<i>Tolomonas osonensis</i> (1)
				<i>Tolomonas auensis</i> (1)
	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Tolomonas</i>	<i>Tolomonas sp.</i> (1)
	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Unclassified_Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas putida</i> (1)
		<i>Unclassified_Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas putida</i> (1)	

As sondas 3,4 e 5 apresentam o mesmo número de estirpes não-*Aeromonas* detetadas (Tabela 2.4), já que fazem o target da mesma região, deslocando-se apenas 1 ou 2 posições no sentido 5'-3'. O que difere ligeiramente nas 3 sondas é o número de estirpe bacterianas que esta deteta. A sonda 3 deteta 2194 estirpes; a sonda 4 deteta 2195 e a sonda 5 deteta 2196.

Tabela 2.4- Estirpes não-*Aeromonas* detetadas pela sonda 3, 4 e 5 .

Classe	Ordem	Família	Género	Espécie
Gammaproteobacteria				<i>bacterium H4 (1)</i>
				<i>Tolumonas osonensis (1)</i>
	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Tolumonas</i>	<i>(1)</i>
				<i>Tolumonas sp. (1)</i>
	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>unclassified_Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas putida (1)</i>
			<i>unclassified_Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas putida (1)</i>
Betaproteobacteria	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>unclassified_Neisseriaceae</i>	<i>Neisseriaceae bacterium (1)</i>
Bacilli	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus danieliae (1)</i>

De seguida procedeu-se ao cálculo da especificidade e sensibilidade das possíveis sondas, com base nos resultados obtidos com o “Probe match”. A sensibilidade é o quociente entre o número de estirpes *Aeromonas* spp. detetadas pelas sondas e o número total de estirpes de *Aeromonas* spp. existentes na base de dados; enquanto a especificidade é o quociente entre o número de estirpes *Aeromonas* spp. detetadas pelas sondas e o número total de estirpes microbianas detetadas pelas sondas. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.5. Verificase que todas as sondas apresentam valores muito elevados de especificidade e sensibilidade, variando entre os 98,3% e os 99,7%. Contudo, contêm percentagem elevada em GC, que pode comprometer o funcionamento da sonda a uma temperatura de hibridação aceitável.

Tabela 2.5- Especificidade e Sensibilidade das sondas para deteção de *Aeromonas* spp.

	5'-3'	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)
1	CCAACCGCCTGCGTG	98,39	98,69
2	TCCAACCGCCTGCGT	99,73	98,61
3	ATCCAACCGCCTGCG	99,68	98,38

4	TATCCAACCGCCTGC	99,68	98,43
5	TTATCCAACCGCCTG	99,68	98,47

De seguida, de forma a tentar baixar a percentagem de GC das potenciais sondas, estas foram analisadas retirando-se nucleótidos como mostra na Tabela 2.6. Na sequência 2 não é possível baixar a percentagem de GC porque não existe nenhum G ou C na extremidade; enquanto as sequências 4 e 5 já apresentam um valor de CG adequado. Por estas razões, estas três sondas não serão abordadas na Tabela 2.6.

Na sonda 1, de forma a tentar baixar a percentagem de GC, é necessário retirar 2 nucleótidos ficando com 69% GC. Para esta sonda existem duas possibilidades, retirar bases C e G nas duas extremidades ou duas bases C em uma das extremidades. Para ambas as situações os valores de percentagem em G e C continuam elevados. Para além disso os valores de especificidade e sensibilidade são afetados, sendo que os valores de sensibilidade aumentam muito ligeiramente, mas os de especificidade diminuem drasticamente, o que compromete o desempenho da sonda. Para a sonda 3 ao retirar um nucleótido a percentagem de GC diminui de 66,7 para 64,3% aumentando o valor da sensibilidade sendo que o da especificidade não é alterado. No caso de se retirar dois nucleótidos a percentagem baixa para 61,5 mantendo os valores de sensibilidade e especificidade do caso anterior.

Tabela 2.6- Avaliação de sequencias mais curtas para as sondas 1 e 3, relativamente à percentagem de GC, e valores de sensibilidade e especificidade. Vermelho- nucleótidos retirados.

	5'-3'	Tm	GC	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Nº não-aeromonas detetadas
	CCAACCGCCTGCGTG	67,82	73,3	98,69	98,39	36
1	CCAACCGCCTGCGTG	58,24	69,2	98,74	67,41	1061
	CCAACCGCCTGCGTG	58,89	69,2	98,87	20,01	8785
	ATCCAACCGCCTGCG	66,06	66,7	98,38	99,68	7
3	ATCCAACCGCCTGCG	62,51	64,3	98,61	99,68	7
	ATCCAACCGCCTGCG	56,20	61,5	98,61	99,68	7

Feita esta análise, verificou-se que para a sonda 3 é possível baixar a percentagem de CG sem comprometer o desempenho da sonda e baixando a Tm para valores adequados. O mesmo não acontece para a sequência 1.

A retirada de nucleótidos nas extremidades 3 ou 5' da sonda 1 faz aumentar o número de sequências não-*Aeromonas*, o que consequentemente baixa a especificidade da sonda.

A sonda 2 também fica excluída pois os parâmetros de GC não estão dentro dos parâmetros adequados e não é possível retirar nucleótidos de forma a baixar a percentagem.

A escolha da potencial sonda recai, portanto, sobre as restantes 3 hipóteses (sondas 3, 4 e 5) que contêm valores de especificidade, sensibilidade e percentagem em GC adequados.

Tendo em conta a semelhança das sequências quanto ao número de targets e non-targets e parâmetros termodinâmicos, optou-se por avaliar a distribuição dos *mismatches* (posições divergentes relativamente a sequências próximas), visto que as sondas com *mismatches* localizados em regiões centrais têm normalmente maior capacidade de discriminação e consequentemente melhor especificidade (Sanguin et al., 2006; Stender, Fiandaca, Hyldig-Nielsen, & Coull, 2002). Para alcançar uma maior discriminação entre as sequências-alvo e as sequências não-alvo que variam apenas com uma única base, a base discriminante deve preferencialmente posicionar-se entre 3 a 5 bases a partir de cada extremidade (Stender et al., 2002).

Com isto, foi feita uma análise da localização dos mismatches para espécies filogeneticamente próximas de *Aeromonas*. O objetivo é escolher a potencial sonda com as posições dos *mismatches* localizados em regiões centrais para uma melhor discriminação de sequências muito próximas.

As estirpes mais próximas pertencem à família *Aeromonadaceae*, que inclui os seguintes géneros: *Tolumonas*, *Oceanimonas*, *Oceanisphaera* e *Zobellella*. As localizações dos mismatches para as sondas estão apresentadas na tabela 2.7.

Tabela 2.7- Localização dos *mismatches* no alinhamento parcial das sondas 3, 4 e 5 com sequências da família *Aeromonadaceae*. As posições com *mismatches* são apresentadas a vermelho

Género	Sonda 3 5' ATCCAACCGCCTGC G 3'	Nº	Sonda 4 5' TATCCAACCGCCTGC 3'	Nº	Sonda 5 5' TTATCCAACCGCCGT 3'	Nº
<i>Tolumonas</i>	T5'gcagggcggttagat P3'CGTCCGCCAACCTA	9	T5'gcagggcggttagata P3'CGTCCGCCAACCTAT	7	T5'cagggcggttagataa P3'GTCCGCCAACCTATT	8
<i>Tolumonas</i>	T5'gcagggcggttggac P3'CGTCCGCCAACCTA	1	T5'gcagggcggttggaca P3'CGTCCGCCAACCTAT	1	T5'cagggcggttggacaa P3'GTCCGCCAACCTATT	1
<i>Oceanimonas</i>	T5'gcagggcggttggtt P3'CGTCCGCCAACCTA	47	T5'gcagggcggttggtta P3'CGTCCGCCAACCTAT	47	T5'cagggcggttggttaa P3'GTCCGCCAACCTATT	47
<i>Oceanisphaera</i>	T5'gcagggcggttggtt P3'CGTCCGCCAACCTA	20	T5'gcagggcggttggtta P3'CGTCCGCCAACCTAT	20	T5'cagggcggttggttaa P3'GTCCGCCAACCTATT	20

Zobellella	T5'gcagggcggtt tg tt P3'CGTCCGCCAAC CT A	3	T5'gcagggcggtt tg tt a P3'CGTCCGCCAAC CT AT	3	T5'cagggcggtt tg tt aa P3'GTC CG C CA AC CT AT	3
Tolomonas	T5'gcag a cggtt tg at P3'CGTCCGCCAAC CT A	1	T5'gcagggcggtt tg tt a P3'CGTCCGCCAAC CT -AT	1	T5'cagggcggtt tg tt a P3'GTC CG C CA AC CT AT	1

Nº - número de sequências; T- Target (região sequência salvo); P- Probe (sequência da sonda)

Pela tabela pode verificar-se que existem diferentes localizações de *mismatches* entre os alinhamentos das sequências das estirpes pertencentes à família *Aeromonadaceae* e as restantes 3 potenciais sondas. Para o género mais próximo de *Aeromonas*, *Tolomonas*, as 3 potenciais sondas analisadas possuem todas um mesmo *mismatch* mas em posições diferentes dependendo da sequência da sonda. Neste caso, o género *Tolomonas* apresenta uma adenina ou invês de uma guanina na região alvo. No caso da terceira sonda a substituição ocorre na 11º posição, em 9 espécies de *Tolomonas*. Nas sondas 4 há a substituição na 11º posição da sequência em 7 espécies de *Tolomonas*, e na sonda 5 ocorre na 10º posição em 8 espécies de *Tolomonas*. Há ainda um segundo tipo de *mismatch* para apenas uma sequência do género *Tolomonas* (número de acesso: S002289282) que é apanhado pelas três sondas. Esta sequência possui uma citosina (ao invês de uma timina) que não hibrida na última, penúltima e antepenúltima posições das sondas 3, 4 e 5, respetivamente.

Para o caso de ocorrência de 2 *mismatches*, mais uma vez, a sonda 5 é a que contempla *mismatches* mais posicionados ao centro da sequência.

Para alcançar melhor discriminação pelas sondas as posições dos *mismatches* deveriam ser localizadas o mais ao centro. Por esta razão a sonda LNA/DNA escolhida foi a seguinte : 5' T+T+A+TCC+AAC+CGC+CTG 3'. Os nucleótidos antecidos de “+” referem-se a posições de LNA, enquanto os restantes são nucleótidos de DNA. A distribuição dos nucleótidos de LNA teve em atenção a posição dos *mismatches* e a proporção LNA/DNA aconselhada na literatura (Robertson & Vora, 2012). A sequência foi sintetizada pela EXIQON (Dinamarca), purificada por HPLC (High performance liquid chromatography) e acoplada com um fluorocromo Tex 615 na extremidade 5'. A sonda foi designada de AerLNA_581, tendo em conta a posição alvo inicial no rRNA 16S.

3. OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL DA SONDA

Neste capítulo encontra-se toda a informação relativa à validação experimental da sonda, ou seja, à otimização das condições de hibridação da sonda, assim como a confirmação experimental dos resultados teóricos obtidos no capítulo 2. É também feita uma otimização baseada em modelos de cinética de hibridação a fim de avaliar a temperatura de hibridação, o efeito do tipo e concentração de desnaturante e concentração salina no sinal de hibridação.

3.1 Métodos Laboratoriais

3.1.1 Microrganismos e condições de cultura

As estirpes bacterianas usadas neste trabalho experimental estão apresentadas na tabela 3.12. Os isolados de *Aeromonas* foram fornecidas pela professora Isabel Henriques (Universidade de Aveiro) e pela professora Célia Manaia (Universidade Católica Portuguesa, Porto). O meio usado para o crescimento de *Aeromonas* foi Luria-Bertani (LB) ágar (Liofilchem) a 30°C por 24 horas.

3.1.2 Método FISH

O método de FISH foi baseado no protocolo descrito por (Vilas Boas et al., 2016) com algumas modificações. Para a otimização do protocolo de hibridação foram variadas algumas condições específicas, tais como, a temperatura, concentração de NaCl e de desnaturante.

Preparou-se um inóculo de cultura fresca do microrganismo a analisar, em água destilada estéril. Colocou-se 20 µL da suspensão preparada em cada poço da lâmina. Em cada poço colocou-se paraformaldeído a 4% seguido de etanol a 50% durante 10 min cada, deixando-se secar ao ar. Colocou-se 15 µL de solução de hibridação em cada poço contendo: 50 mM a 900 mM de NaCl (Labchem), 0,01% SDS, 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5; Sigma), desnaturante (Formamida, Ureia e Etileno Carbonato) e 200 nM de sonda *Aeromonas* descrita no capítulo anterior. Os intervalos de concentrações utilizados para cada um dos compostos desnaturantes estão indicados na tabela 3.1.

Tabela 3.1- Desnaturantes e respectivos intervalo de concentrações usados na solução de hibridação

Desnaturante	Concentrações testadas
Formamida	30%
Ureia	0.5 M e 4M
Etileno carbonato	17% - 33%

Cobriram-se as amostras com lamelas e colocaram-se as lâminas dentro de caixas de Petri embrulhadas em papel de alumínio e com papel absorvente húmido dentro destas. As lâminas foram incubadas durante 60 min a temperaturas de hibridação que variaram entre 60°C a 70°C (Termaks, Series B8054). Após o tempo de hibridação, as lamelas foram removidas e as lâminas foram colocadas em jarros em contacto com a solução de lavagem, pré-aquecida (à mesma temperatura que decorreu a hibridação) durante 30 min. A solução de lavagem contém 50 mM NaCl (Sigma), 0,01% SDS, e 20 mM Tris-HCl (pH7.5; Sigma). Após o tempo de lavagem retiraram-se as lâminas, deixaram-se secar ao ar e procedeu-se á observação ao microscópio (Nikon Eclipse 80i epifluorescence), colocando óleo de emersão sobre cada poço. O filtro do microscópio utilizado para visualização foi o spRed.

3.1.3 Determinação da sensibilidade e especificidade experimental

A determinação dos valores experimentais de sensibilidade e especificidade da sonda foi feita utilizando as bactérias da tabela 3.12. Foram feitas suspensões de culturas frescas (incubadas durante 24h) e foram sujeitas ao protocolo LNA-FISH, descrito já anteriormente. Os valores experimentais de sensibilidade foram calculados através da seguinte fórmula: $VP/(VP+FN) \times 100$, onde VP são os verdadeiros positivos (estirpes de *Aeromonas* detetadas) e FN são os falsos negativos (estirpes de *Aeromonas* não detetadas). A especificidade da seguinte forma: $VN/(VN+FP) \times 100$, onde VN são os verdadeiros negativos (estirpes não *Aeromonas* com sinal negativo de hibridação) e FP são os falsos positivos (estirpes não *Aeromonas* com sinal positivo).

3.1.4 Desenho experimental e análise estatística por RSM

RSM foi utilizado para estudar a influência da temperatura de hibridação, concentração de NaCl e concentração de desnaturante na solução de hibridação na otimização da sonda

universal EUB338 de LNA/2-O-methyl, com as características descritas na secção seguinte. Os ensaios foram realizados com a estirpe *Aeromonas hydrophila* IR 13 AH.

As experiências foram criadas utilizando o software estatístico Design Expert® 8.0.7.1 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) e o padrão do software, o “*central composite design*” (CCD) foi o selecionado para estimar os coeficientes do modelo. As variáveis testadas foram a temperatura, concentração de desnaturante e concentração de NaCl. Relativamente ao desnaturante, foram estudados os 3 utilizados na otimização experimental da sonda, ou seja, a formamida, ureia e etileno carbonato. Cada uma das três variáveis assume 5 diferentes valores experimentais que são os usados para os pontos do desenho experimental. Cada CCD inclui 8 pontos fatoriais (codificados como ± 1), 6 pontos axiais (codificados como $\pm \alpha$) que representam os valores extremos e 6 pontos centrais (codificados como 0) que são repetidos para levar em conta o erro experimental (Silva, Camargo, & Ferreira, 2011). O desenho do modelo consiste em 20 experiências que depois de realizadas e quantificado o seu sinal de fluorescência, os valores de intensidade são inseridos no software gerando assim um modelo quadrático. As tabelas 3.2-3.4 mostram os níveis das variáveis independentes máximos e mínimos definidos no CCD para cada tipo de desnaturante. A variável dependente foi escolhida como sendo a intensidade de fluorescência.

Tabela 3.2- Níveis experimentais das variáveis testadas para a intensidade de fluorescência relativamente ao desnaturante Formamida.

Variáveis Independentes	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura (°C)	40	50.1	65	79.9	90
[NaCl] (M)	1.5	2.40	3.75	5.09	6
[Formamida] (% V/V)	0	3.5	8.75	14	17.5

Tabela 3.3- Níveis experimentais das variáveis testadas para a intensidade de fluorescência relativamente ao desnaturante Ureia.

Variáveis Independentes	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura (°C)	40	50.1	65	79.9	90
[NaCl] (M)	1.5	2.40	3.75	5.09	6
[Ureia] (M)	0.5	1.41	2.75	4.09	5

Tabela 3.4- Níveis experimentais das variáveis testadas para a intensidade de fluorescência relativamente ao desnaturante Etileno Carbonato.

Variáveis Independentes	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Temperatura (°C)	40	50.1	65	79.9	90

[NaCl] (M)	1.5	2.40	3.75	5.09	6
[Etileno Carbonato] (% V/V)	0	3.5	8.75	14	17.5

A sonda usada como sonda modelo para a otimização da hibridação por RSM foi a sonda universal EUB338 de LNA/2-O-methyl com a sequência:

5'- +TmGmC+CmUmC+CmCmG+TmAmG+GmA -3', em que os sinais “+” indicam os nucleótidos de LNA e “m” os nucleótidos de 2-O-methyl. A sonda foi sintetizada pela Exiqon (Dinamarca), purificada por HPLC e acoplada ao fluorocromo 6-FAM (6-Carboxifluoresceína) na extremidade 5'.

O método de hibridação seguido foi o descrito por (Silvia Fontenete et al., 2013) com algumas modificações. Um ml de cultura de *Aeromonas* crescida em LB, com uma DO₆₀₀ de aproximadamente 1 foi sedimentada por centrifugação a 10 000g (Microcentrífuga Micro Star 12, VWR) durante 5min. Ressuspenderam-se as células em 400 µl de 4% paraformaldeído e incubou-se durante 1h à temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente a amostra, adicionaram-se 500 µl de etanol 50% ao *pelet* e incubou-se durante pelo menos 30 min a -20°C. Depois da fixação das células, retirou-se 100 µl da alíquota, centrifugou-se novamente e ressuspenderam-se as células em 100 µl de solução de hibridação com 200 nM de sonda de EUB338. Incubou-se durante 60 min. Após o tempo de hibridação, levaram-se as amostras a centrifugar, retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se 500 µl de solução de lavagem. Homogeneizou-se a amostra e levou-se a incubar durante 30 min. Depois da lavagem das amostras centrifugou-se novamente e ressuspendeu-se em 700 µl de NaCl 0.8% para posterior observação por citometria de fluxo. Cada condição testada foi realizada em triplicado.

Para cada experiência foi feito um controle negativo simultaneamente, com todos os passos realizados de igual forma, mas sem adição de sonda durante a hibridação.

Quanto à intensidade de fluorescência das amostras hibridadas e respectivos controles negativos, foi quantificada por citometria de fluxo (Sony Biotechnology ec800). Foram avaliados os parâmetros de dispersão frontal (*forward light scatter* - FS) lateral (*side light scatter* - SS) da luz e intensidade de fluorescência verde (FL1) em escala logarítmica. Um mínimo de 20 000 eventos foram definidos e os dados foram analisados pelo software ec800 v 1.3.6 e a intensidade média de fluorescência determinada para cada experiência em triplicado.

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Otimização da sonda

Nesta secção pretendeu-se testar várias condições de modo a otimizar a hibridação da sonda AerLNA_581. Estas condições incluíram por exemplo: a temperatura de hibridação e lavagem; a quantidade de NaCl nas soluções de hibridação e lavagem; a presença de quelante de iões divalentes; o tipo e concentração de desnaturantes. Cada um destes parâmetros pode ter uma ação preponderante na qualidade da hibridação, geralmente relacionada com melhoria das condições de acessibilidade à região alvo. A etapa de otimização é bastante importante pois são testados os parâmetros que têm influencia sobre a performance da hibridação da sonda, isto é, permitindo uma intensidade de sinal de fluorescência forte.

Na tabela 3.5 estão descritos os possíveis papéis de cada um destes parâmetros na hibridação da sonda com a sua sequência alvo.

Tabela 3.5- Função dos compostos na solução de hibridação. A informação da tabela foi compilada com base em (Azevedo, 2005).

Composto	Função
NaCl	Concentração elevada aumenta a taxa de reação. Estabiliza estruturas secundárias de RNA e estabiliza a duplex sonda/RNA.
Desnaturante	Solventes orgânicos que reduzem a estabilidade térmica de modo a que a hibridação seja realizada a temperaturas mais baixas.
SDS	Detergente que afeta a permeabilização da membrana
Tris-Hcl	Atua como tampão para controlo do pH da hibridação
Citrato de sódio	Agente quelante de iões que remove catiões divalentes livres. Pode, portanto, ajudar na destabilização das estruturas secundárias do RNA.

A utilização de desnaturantes é essencial para reduzir a T_m da hibridação e aumentar a precisão da ligação da sonda as sequências alvo (Sílvia Fontenete, Leite, et al., 2015). Elevadas concentrações de desnaturante, teoricamente favorecem a estringência da ligação (Stender et al., 2002). No entanto concentrações demasiado elevadas podem impedir por completo a ligação ao alvo. Daí que seja essencial o controlo deste parâmetro.

Começou-se, portanto, por testar como agente desnaturante a formamida como descrito no protocolo seguido, a uma concentração de 30% (Vilas Boas et al., 2016). Além disso, a formamida é um dos solventes mais usados em FISH por baixar a temperatura de emparelhamento das cadeias de ácidos nucleicos (Matthiesen & Hansen, 2012). Uma das

principais vantagens em usar Formamida é a melhor preservação da morfologia devido a uma temperatura de incubação menor (Matthiesen & Hansen, 2012).

Começou-se variando a temperatura para a concentração de formamida normalmente utilizada pelos autores, como descrito na tabela 3.6. As diferentes temperaturas testadas permitiram obter uma hibridação com estirpes *Aeromonas* com sinal fluorescente intenso; no entanto, ao testar com espécies próximas, mais precisamente com espécies de *Vibrio*, também se obteve sinal de hibridação apesar de apresentar uma intensidade de fluorescência fraca. Como não foi possível obter um sinal específico, optou-se por alterar o tipo de desnaturante.

Tabela 3.6 - Resultados do LNA-FISH para a sonda AerLNA_581 exposta a uma solução de hibridação contendo formamida a 30% e a temperaturas de hibridação distintas. A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 900 mM de NaCl; 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.

Estirpe	Temperatura de hibridação (°C)			
	60°C	62°C	64°C	66°C
<i>Aeromonas veronii</i> IR 112 (281)	+	+	+	+
<i>Aeromonas veronii</i> IR 109(276)	+	+	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i> IR32	+	+	+	+
<i>Vibrio fluvialis</i> M44	+	+ -	+ -	+ -
<i>Vibrio alginolyticus</i> M17	+	+ -	+ -	+ -

+ : Sinal de hibridação forte; + - : Sinal de hibridação fraco

Na tentativa de melhorar a especificidade da sonda, alterou-se o agente desnaturante para Ureia também descrito como eficiente em FISH e por existirem estudos em que testaram este desnaturante em alternativa à formamida, evidenciando resultados superiores aos observados com formamida (Fontenete et al., 2013; Lawson, Connally, Vemulpad, & Piper, 2012; Søe, Møller, Dufva, & Holmstrøm, 2011). Ao contrario da formamida, a ureia não é toxica e pode atuar como um agente permeabilizante adicional resultando num aumento de

intensidade do sinal em FISH (Lawson et al., 2012). A ureia favorece a hibridação ao aumentar a intensidade do sinal e reduzir a temperatura de melting (Lawson et al., 2012).

Começou por testar-se uma concentração baixa de 0.5 M, com base noutros protocolos já descritos (Fontenete, Leite, et al., 2015). Contudo, verificou-se igualmente hibridação com *Vibrio* (tabela 3.7), independentemente da temperatura de hibridação usada.

Tabela 3.7 - Resultados do LNA-FISH para a sonda AerLNA_581 exposta a uma solução de hibridação contendo ureia a 0,5M, e a temperaturas de hibridação distintas. A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 900 mM de NaCl; 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.

Estirpe	Temperatura de hibridação (°C)	
	62°C	64°C
<i>Aeromonas veronii</i> IR 112(281)	+	+
<i>Aeromonas veronii</i> IR 109(276)	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i> IR 32	+	+
<i>Vibrio fluvialis</i> M44	+ -	+ -
<i>Vibrio alginolyticus</i> M17	+ -	+ -

+ : Sinal de hibridação forte; + - : Sinal de hibridação fraco

Aumentou-se então a concentração para 4M, uma concentração também usada por alguns autores que trabalham com sondas de LNA (Fontenete et al., 2016; Sjøe et al., 2011). Alargou-se também os intervalos de temperaturas de hibridação e da concentração de NaCl nas soluções de hibridação e lavagem, para perceber se teriam algum efeito na qualidade e especificidade da hibridação. Está descrito que a concentração de NaCl, ou a força iónica, aumenta a taxa de reação e estabiliza estruturas secundárias de RNA, assim como a duplex de sonda/alvo (Azevedo, 2005).

De todas as condições testadas, 4M de Ureia com concentração de 150 mM NaCl a uma temperatura de 70°C foi a que resultou em um bom sinal positivo de hibridação para *Aeromonas* e um sinal negativo para *Vibrio* (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 - Resultados do LNA-FISH para a sonda AerLNA_581 exposta a uma solução de hibridação contendo ureia a 4M e NaCl a 150 ou 300 nM; e a temperaturas de hibridação distintas (TH). A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.

TH	62°C		64°C			66°C			68°C			70°C	
NaCl (mM)	900	300	900	300	150	900	300	150	900	300	150	150	
<i>Aeromonas veronii</i> IR 112(281)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Aeromonas veronii</i> IR 109(276)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Aeromonas hydrophila</i> IR 32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Vibrio fluvialis</i> M44	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	-	
<i>Vibrio alginolyticus</i> M17	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	-	

+ : Sinal de hibridação forte; + - : Sinal de hibridação fraco

No entanto, visto que 70°C é uma temperatura de hibridação muito elevada tentou-se baixar a temperatura reduzindo a concentração de NaCl (Tabela 3.9). A condição com uma concentração de 50mM de NaCl e temperatura a 68°C foi a que forneceu os melhores resultados relativamente á hibridação com as estirpes de *Aeromonas*, permitindo também uma ligação específica visto que não foi observado sinal de fluorescência com as estirpes de *Vibrio*.

Tabela 3.9 - Resultados do LNA-FISH para a sonda AerLNA_581 exposta a uma solução de hibridação contendo ureia a 4M e NaCl a 50 mM; e a temperaturas de hibridação distintas (TH). A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.

Estirpe	Temperatura de hibridação (°C)	
	66°C	68°C
<i>Aeromonas veronii</i> IR 112(281)	+	+
<i>Aeromonas veronii</i> IR 109(276)	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i> IR 32	+	+

<i>Vibrio fluvialis</i> M44	+ -	-
<i>Vibrio alginolyticus</i> M17	+ -	-

+ : Sinal de hibridação forte; + - : Sinal de hibridação fraco

No entanto ao testar a sonda com estas condições num grupo de estirpes mais alargado, ou seja, um grupo de 12 estirpes (Tabela 3.10), foi possível observar a ocorrência de hibridação parcial com outras espécies não *Aeromonas*. Apesar de algumas espécies não apresentarem reatividade cruzada, as espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens* evidenciaram sinal de fluorescência fraco (Tabela 3.10).

Tabela 3.10 - Resultados do LNA-FISH para a sonda AerLNA_581 exposta a uma solução de hibridação contendo ureia a 4M e NaCl a 50 mM; e a temperatura de hibridação 68°C. A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.

Estirpes	Resultado
<i>Aeromonas veronii</i> IR 112 (281), IR 107 (276), IR 109 (276), IR 163, E4GC165, E4GC158, E4GC61	+
<i>Aeromonas veronii</i> IR 87	+
<i>Aeromonas hydrophila</i> IR 108 (277), IR 37 (92), IR 41 (102), IR 8, IR 13, IR 32, E4FC48B, A4GC137	+
<i>Aeromonas jandaei</i> IR 14, IR 69, IR 73,	+
<i>Aeromonas salmonicida</i> H16C428, M5	+
<i>Aeromonas salmonicida</i> CECT 894	+ -
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> MB2023, MB2	-
<i>Vibrio metschnikovii</i> M668, M98	-
<i>Vibrio vulnificus</i> 2838	-
<i>Vibrio fluvialis</i> M44	-
<i>Vibrio cincinnatiensis</i> M56	+ -
<i>Vibrio mimicus</i> M30	-
<i>Vibrio harveyi</i> CCM 2580	-
<i>Vibrio anguillarum</i> M74	-
<i>Vibrio alginolyticus</i> CECT 600, M17, MB7, CECT 522	-
<i>Vibrio furnissii</i> M51	-
<i>Vibrio breoganii</i> Vb 304	+ -
<i>Vibrio orientalis</i> M102	-
<i>Escherichia coli</i> 4783	-
<i>Escherichia coli</i> CECT 832	+ -

<i>Salmonella dublin</i> 2470	-
<i>Salmonella</i> 2476	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	+ -
<i>Yersinia</i> ESGSC 5429	+
<i>Shigella flexneri</i> 12022	+ -
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 911, CECT 938	+ -
<i>Bacillus cereus</i>	+ -
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 27663	+ -

+ : Sinal de hibridação forte; + - : Sinal de hibridação fraco; - : Sinal negativo

Foi então testado outro agente desnaturante, o Etileno Carbonato, também descrito como eficiente e apresentando maiores vantagens face, por exemplo, à Formamida (Matthiesen & Hansen, 2012). A sua presença parece aumentar a taxa de hibridação, baixar a temperatura de desnaturação e reduzir o “background” (Matthiesen & Hansen, 2012). Tal como a ureia, também é um componente não-toxico.

Mantiveram-se as condições já definidas anteriormente como as que forneceram os melhores resultados, ou seja, 50 mM de NaCl e temperatura 68°C. Alargou-se o conjunto de estirpes testadas pois para as espécies *Vibrio* o sinal de hibridação já é um sinal negativo. Variando as percentagens de Etileno carbonato como mostra na tabela 3.11 continuou a ocorrer alguma hibridação com espécies não- *Aeromonas*. Subiu-se a temperatura para 70°C. A condição que forneceu os melhores resultados foi a de uma percentagem de 20% de Etileno Carbonato resultando num maior grupo de estirpes com sinal de hibridação negativo e uma pequena percentagem com um sinal positivo, mas muito fraco (sinal “+ - -”). Das 12 estirpes não-*Aeromonas* selecionadas, 7 deram negativo como esperado, enquanto apenas 5 apresentaram um sinal muito fraco de hibridação. Tendo em conta que estas foram as melhores condições de hibridação obtidas, decidiu-se avançar com um teste de especificidade/sensibilidade mais alargado de forma a avaliar o real efeito destas condições na performance da sonda.

Tabela 3.11 – Resultados do LNA-FISH para a sonda AerLNA_581 exposta a diferentes concentrações de etileno carbonato na solução de hibridação e a temperaturas de hibridação distintas (TH). A restante composição da solução de hibridação foi fixada nos seguintes parâmetros: 50 mM NaCl; 0,01% SDS; 30 mM citrato de sódio, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) e 200 nM de sonda.

Estirpe	68°C				70°C			
	17%	23%	29%	33%	20%	23%	26%	29%
<i>E. Coli</i> 4783	-	+	-	+	-	-	+--	+

<i>E coli</i> CECT 832	+	+	+	+	+-	-	+-	-
<i>Salmonella</i> 2470 (Dublin)	+	+	-	+	+-	-	-	+
<i>Salmonella</i> 2476	+	+	-	+	-	+-	+	+
<i>Aeromonas</i> E4GC165	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Aeromonas</i> IR 108(277) AH	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Aeromonas</i> IR 13 AH	++	++	++	++	++	++	++	++
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 11296	+	+	-	+	+-	+-	+	+
<i>Yersinia</i> ESGSC 5429	+	-	-	+	+-	-	-	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	-	+-	+-	+
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> CECT 911	-	-	+	+	-	+-	+-	+
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> CECT 938	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Bacillus Cereus</i>	+	-	+	+	+-	+-	+-	-
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i>	+	-	+	+	-	-	+-	+
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> ATCC 27663	+	-	-	+	-	+-	+-	+

++ : Sinal de hibridação forte; + : Sinal de hibridação fraco; +- : Sinal de hibridação muito fraco; - : Sinal negativo

3.2.2 Teste de especificidade da sonda de *Aeromonas* spp.

Foram testadas cerca de 51 estirpes bacterianas incluindo 22 estirpes do género *Aeromonas*, estirpes próximas filogeneticamente e estirpes também capazes de ser patogénicas para peixes (Tabela 3.9). As estirpes foram sujeitas ao protocolo de hibridação em lâmina, nas melhores condições apuradas na secção anterior. De forma breve, a solução de hibridação conteve Etileno Carbonato a 20% e NaCl a 50 mM; e temperatura de hibridação foi de 70°C.

Tabela 3.12 - Resultados teste especificidade e sensibilidade

Bactérias	Resultado
<i>Aeromonas veronii</i> IR 112 (281), IR 107 (276), IR 109 (276), IR 163, E4GC165, E4GC158, E4GC61	++
<i>Aeromonas veronii</i> IR 87	+
<i>Aeromonas hydrophila</i> IR 108 (277), IR 37 (92), IR 41 (102), IR 8, IR 13, IR 32, E4FC48B, A4GC137	++
<i>Aeromonas jandaei</i> IR 14, IR 69, IR 73,	++
<i>Aeromonas salmonicida</i> H16C428, M5	++
<i>Aeromonas salmonicida</i> CECT 894	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> MB2023, MB2	-
<i>Vibrio metschnikovii</i> M668, M98	-
<i>Vibrio vulnificus</i> 2838	-
<i>Vibrio fluvialis</i> M44	-
<i>Vibrio cincinnatiensis</i> M56	+--
<i>Vibrio mimicus</i> M30	-
<i>Vibrio harveyi</i> CCM 2580	-
<i>Vibrio anguillarum</i> M74	-
<i>Vibrio alginolyticus</i> CECT 600, M17, MB7, CECT 522	-
<i>Vibrio furnissii</i> M51	-
<i>Vibrio breoganii</i> Vb 304	+--
<i>Vibrio orientalis</i> M102	-
<i>Escherichia coli</i> 4783	-
<i>Escherichia coli</i> CECT 832	+--
<i>Salmonella dublin</i> 2470	+--
<i>Salmonella</i> 2476	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	+--
<i>Yersinia</i> ESGSC 5429	+--
<i>Shigella flexneri</i> 12022	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 911, CECT 938	-
<i>Bacillus cereus</i>	+--
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 27663	-

++ : Sinal de hibridação forte; + : Sinal de hibridação fraco; +-- : Sinal de hibridação muito fraco; - : Sinal negativo

Segundo a tabela 3.12 a sonda mostrou-se eficiente na detecção de *Aeromonas*, havendo duas estirpes que apresentaram sinal não tão intenso, mas claramente positivo. Relativamente a espécies não *Aeromonas* parece ainda ocorrer alguma hibridação em algumas das espécies, mas originou um sinal muito fraco, muito próximo de um sinal negativo.

A figura 3.1 mostra a hibridação da sonda com uma estirpe *Aeromonas* IR 13AH, onde é possível verificar o sinal positivo no canal vermelho (filtro spRed) e a ausência de sinal no canal verde (filtro FITC) do microscópio, revelando que a fluorescência da primeira foto é causada apenas por hibridação e não outro tipo de sinal de autofluorescência. A figura 3.2 mostra a hibridação com uma estirpe *Vibrio fluvialis* M44 resultando em sinal negativo.

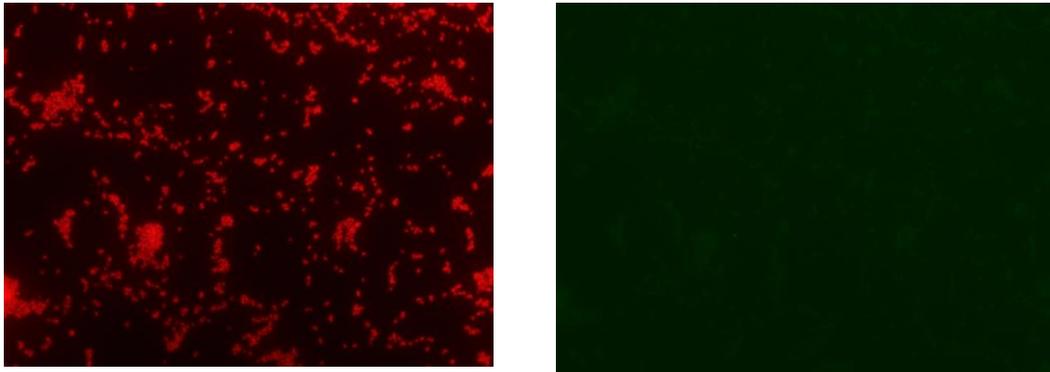


Figura 3.1- Resultado da hibridação em lâmina de *Aeromonas* IR 13 AH, obtido por o microscópio de fluorescência, com o respetivo controlo negativo

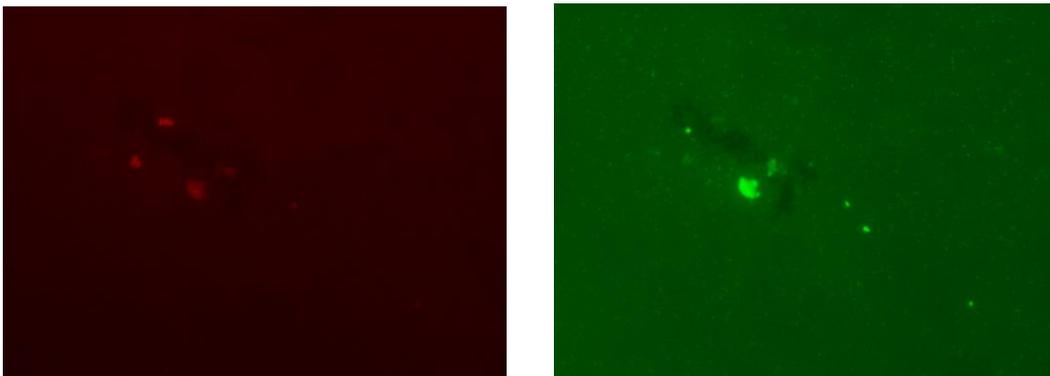


Figura 3.2- Resultado da hibridação em lâmina de *Vibrio fluvialis* M44, obtido por o microscópio de fluorescência, com o respetivo controlo negativo

Apesar dos vários parâmetros testados na otimização da sonda de *Aeromonas* não foi possível eliminar completamente a hibridação cruzada com espécies não -*Aeromonas*. Com base nestes dados foi possível apurar valores de especificidade de 75% (Intervalo de confiança [CI] de 95%, 56% - 89%) e de sensibilidade de 100% (CI 95%, 82% - 100%).

Apesar dos valores da performance experimental da sonda não serem satisfatórios, a observação de que há uma relação muito forte entre o tipo e concentração de desnaturante e a concentração salina usada na solução de hibridação foi evidente. Isto aponta claramente para a falta de conhecimento das relações entre estes parâmetros e o seu efeito na temperatura de hibridação, em particular para o mimico em estudo. De facto, existem já dois trabalhos que se dedicaram ao estudo do efeito dos parâmetros de hibridação na eficiência da cinética de ligação,

mas ambos foram limitados a moléculas de PNA (Rocha, Santos, Madureira, Almeida, & Azevedo, 2016; Santos et al., 2014), pelo que pouco ou nada se sabe quanto ao comportamento de outros mímicos como o LNA.

Para melhor elucidar este comportamento utilizou-se o método RSM para otimizar a fluorescência para a bactéria *Aeromonas* utilizando a sonda EUB338 de LNA/2-O-methyl.

3.2.3 Modelo de regressão de resposta e determinação das condições ótimas

Começou-se por tentar um desenho experimental para o desnaturante formamida em que os níveis das variáveis foram definidos de acordo com a experiência adquirida no capítulo anterior e também com base na bibliografia (Fontenete et al., 2013; Priya et al., 2012; Vilas Boas et al., 2016). Um valor ótimo não foi obtido de início (Tabela 3.13: ensaios 1, 2 e 3), observando-se no modelo uma tendência para temperaturas mais altas, percentagem de Formamida mais baixa e concentração de NaCl mais alta (ver anexo I, figuras 1-6).

De maneira a obter um modelo valido, foram necessárias 4 tentativas a redesenhar o CCD (tabela). Apenas no ensaio 4 se obteve um modelo satisfatório ficando então os níveis de NaCl e temperatura definidos para os 3 desnaturantes testados; pelo que na tabela 3.14 é possível verificar os níveis definidos para os outros desnaturantes avaliados, ureia e etileno carbonato.

Tabela 3.13- Níveis definidos das variáveis testadas para a formamida

	- α	-1	0	+1	+ α
<u>Ensaio 1</u>					
Temperatura (°C)	30	38.11	50	61.89	70
[NaCl] (M)	0	0.30	0.75	1.20	1.50
[Formamida] (% V/V)	0	14.19	35	55.81	70
<u>Ensaio 2</u>					
Temperatura (°C)	30	40.1	55	69.9	80
[NaCl] (M)	0	0.30	0.75	1.20	1.50
[Formamida] (% V/V)	0	7.1	17.5	28	35
<u>Ensaio 3</u>					
Temperatura (°C)	40	48.1	60	71.9	80
[NaCl] (M)	0	0.6	1.5	2.39	3
[Formamida] (% V/V)	0	3.5	8.75	14	17.5
<u>Ensaio 4</u>					
Temperatura (°C)	40	50.1	65	79.9	90
[NaCl] (M)	1.5	2.40	3.75	5.09	6

[Formamida] (% V/V)	0	3.5	8.75	14	17.5
---------------------	---	-----	------	----	------

Tabela 3.14- Níveis definidos das variáveis testadas para a ureia e etileno carbonato

	- α	-1	0	+1	+ α
Temperatura (°C)	40	50.1	65	79.9	90
[NaCl] (M)	1.5	2.40	3.75	5.09	6
[Ureia] (% P/V)	0.5	1.41	2.75	4.09	5
Temperatura (°C)	40	50.1	65	79.9	90
[NaCl] (M)	1.5	2.40	3.75	5.09	6
[Etileno carbonato] (% V/V)	0	3.5	8.75	14	17.5

Usando estes níveis finais definidos, modelos quadráticos significantes foram obtidos para os três tipos de desnaturantes testados. Foram realizados 20 ensaios experimentais com diferentes combinações dos três parâmetros analisados, para cada tipo de desnaturante. A seleção das 20 combinações foi feita pelo programa.

Depois de realizar o conjunto das 20 experiências foram analisados os valores da ANOVA para cada modelo quadrático como mostra a tabela 3.15. O F-value dos modelos indica que os modelos são ambos significantes. Quanto aos valores de p-value, quando menores que 0,05 indicam que são significantes, o que neste caso para os três modelos verifica-se que são significantes. Quanto aos valores de “*lack-of-fit*” do p-value é expectável que sejam não significantes, significa que a falta de ajuste não é significativa em relação ao erro. Neste caso só o modelo com o desnaturante ureia é que mostrou ser significativo, o que apesar de tudo não é problemático pois é visível uma tendência geral no gráfico. Os valores de R^2 superiores a 0.75 indicam também bons modelos (Mandenius & Brundin, 2008), e neste caso acontece para os três modelos o que indica um bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

Tabela 3.15- Análise de variância (ANOVA) para cada modelo de cada desnaturante

	Formamida	Ureia	Etileno Carbonato
Model F-value	7.03	4.83	6.26
Model p-value	0.027	0.0109	0.0042
Lack-of-fit p-value	0.3980	0.0014	0.2581
Model R^2	0.8635	0.8128	0.8493

Outro parâmetro que foi analisado, o coeficiente de variação (CV), que indica o nível de precisão com que os dados são comparados. Para uma boa consistência da experiência o CV

deve apresentar valores baixos. Para a formamida, ureia e etileno carbonato obtiveram-se valores de 18.03, 25.89 e 17.37 respectivamente, indicando a precisão da experiência.

De seguida são apresentadas as equações polinomiais de segunda ordem que descrevem a eficiência de hibridação na sonda de LNA/2-O-methyl em *Aeromonas*.

Tabela 3.16- Modelos quadráticos para *Aeromonas* para os diferentes desnaturantes em estudo considerando o efeito da temperatura (X1), concentração de desnaturante (X2) e concentração de NaCl (X3) e suas interações na intensidade de fluorescência (Y).

Modelo	
Formamida	$Y = 2099.42 - 95.43x_1 - 2.65x_2 + 89.42x_3 + 40.04x_1x_2 - 98.75x_1x_3 + 387.92x_2x_3 - 473.08x_1^2 - 155.44x_2^2 - 150.36x_3^2$
Ureia	$Y = 2132.49 - 641.90x_1 - 40.89x_2 + 141.81x_3 + 41.72x_1x_2 - 205.01x_1x_3 + 456.70x_2x_3 - 347.88x_1^2 - 32.19x_2^2 - 68.74x_3^2$
Etileno Carbonato	$Y = 2360.41 - 374.83x_1 - 104.32x_2 + 58.60x_3 + 318.87x_1x_2 - 144.56x_1x_3 + 193.49x_2x_3 - 340.50x_1^2 - 259.86x_2^2 - 129.58x_3^2$

Os gráficos da intensidade de fluorescência prevista avaliada pelo modelo (Figuras 3.3, 3.4 e 3.5) em relação aos valores experimentais reais obtidos mostram uma boa correlação, indicando que os valores experimentais reais estão de acordo com os previstos pelo modelo.

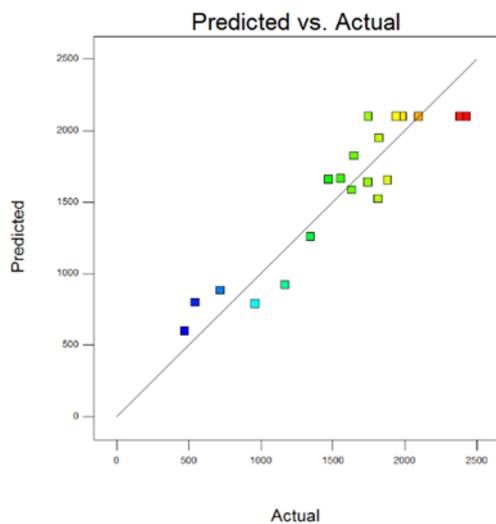


Figura 3.3- Intensidade de fluorescência observada vs intensidade de fluorescência prevista para a Formamida.

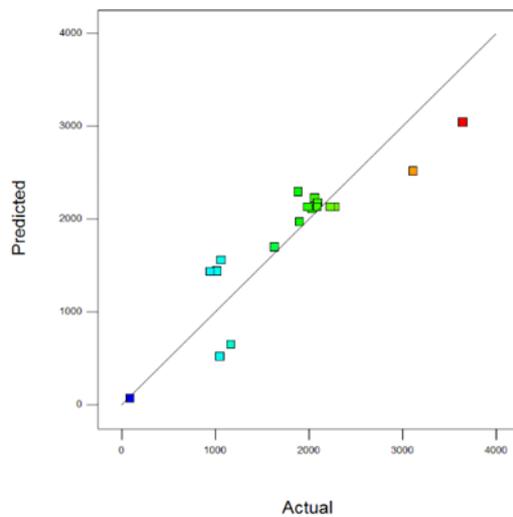


Figura 3.4- Intensidade de fluorescência observada vs intensidade de fluorescência prevista para a Ureia.

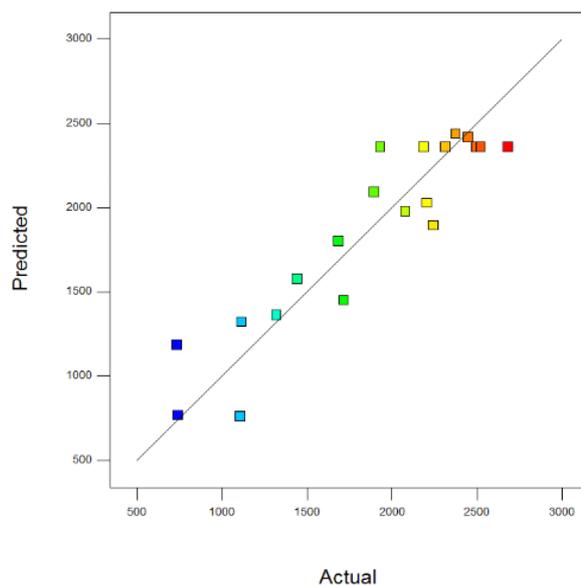


Figura 3.5- Intensidade de fluorescência observada vs intensidade de fluorescência prevista para o Etileno Carbonato.

Os modelos em 3D permitem entender quais os valores ótimos das variáveis e o tipo de interação observada para níveis de fluorescência máxima. Observando a interação entre a temperatura e a concentração de NaCl mantendo a concentração do respectivo desnaturante no seu valor ótimo (figuras 3.6, 3.7 e 3.8) foi obtido um espaço ótimo de temperatura e NaCl para cada um do desnaturante com uma área mais ou menos extensa.

As figuras obtidas neste estudo sugerem que quando as concentrações de desnaturante estão nos seus ótimos, a eficiência de hibridação aumenta com o aumento da concentração de NaCl e para temperaturas à volta dos 50°C (para ureia e etileno carbonato) ou 60°C (no caso da formamida).

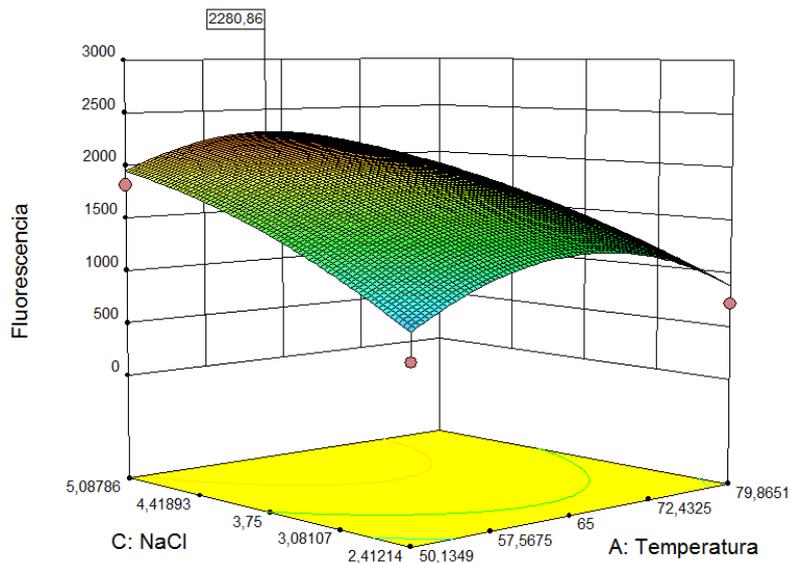


Figura 3.6- Superfície de resposta que representa o efeito da interação da temperatura e concentração de NaCl na resposta de fluorescência com uma concentração de Formamida constante de 14%.

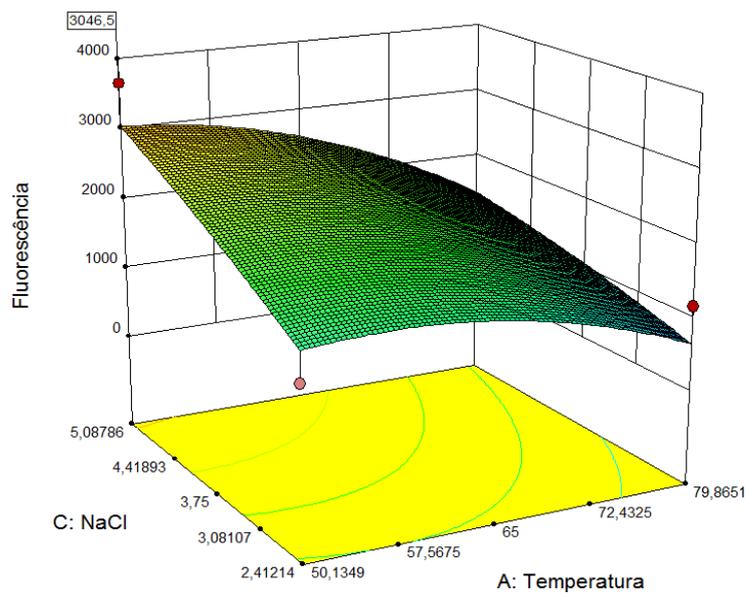


Figura 3.7- Superfície de resposta que representa o efeito da interação da temperatura e concentração de NaCl na resposta de fluorescência com uma concentração de Ureia constante de 4.1M.

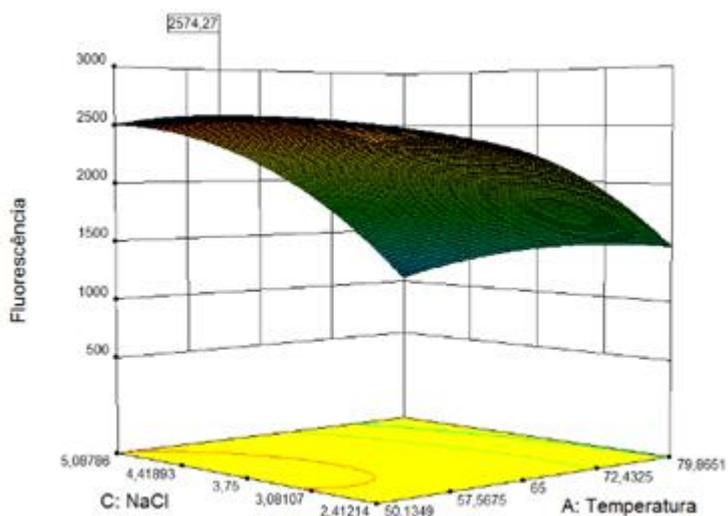


Figura 3.8- Superfície de resposta que representa o efeito da interação da temperatura e concentração de NaCl na resposta de fluorescência com uma concentração de Etileno Carbonato constante de 5%.

A técnica de RSM permitiu também determinar quais as condições de hibridação ideais, ou seja, as que apresentariam uma intensidade de fluorescência mais alta. Os parâmetros ótimos para cada desnaturante estão apresentados na tabela 3.17. O desnaturante Ureia é o que apresenta maior intensidade de fluorescência. A temperatura encontra-se entre os 50°C e os 63°C para todos os desnaturantes. Valores das temperaturas altos aumentam a acessibilidade ao RNA e a permeabilidade das células.

A concentração de NaCl encontra-se entre os 4 e 5 M para os três casos, o que de facto é um valor muito acima das concentrações normalmente utilizadas na literatura que geralmente rondam os valores entre 100 mM e 900 mM (Fontenete et al., 2013; Robertson & Vora, 2012; Vilas Boas et al., 2016).

Quanto à concentração de desnaturantes, a Formamida apresenta um valor baixo que vai de encontro com a literatura, em que outros autores já observaram que baixas concentrações de formamida ou mesmo a sua remoção pode conduzir a valores mais altos de fluorescência (Bond & Banfield, 2001; Yilmaz & Noguera, 2004). A concentração de Ureia de 4M está de acordo com os valores normalmente usados em trabalhos com sondas de LNA (Fontenete et al., 2013; Vilas Boas et al., 2016). Para o Etileno Carbonato um valor de 5% parece ser o suficiente para uma ótima intensidade de fluorescência, mas de facto não estão descritos valores tão baixos para protocolos de FISH (Matthiesen & Hansen, 2012). De entre os 3 desnaturantes estudados, este é sem dúvida o menos utilizado, pelo que é expectável que a sua concentração não esta devidamente otimizada, especialmente quando aplicado com mímicos de ácidos nucleicos, cujos parâmetros termodinâmicos são distintos das tradicionais sondas de DNA ou RNA.

Com base nos resultados obtidos é possível propor um método de LNA FISH ótimo para *Aeromonas*, em termos de qual o melhor desnaturante e sua respetiva concentração, a temperatura de hibridação e concentração salina de modo a melhorar os protocolos de hibridação utilizados. De qualquer forma, a temperatura será sempre dependente da sequência da sonda, pelo que deverá ser usada apenas como referência para outros trabalhos.

Já relativamente aos restantes parâmetros, apesar de haver sempre a necessidade de se ajustarem ligeiramente os parâmetros dependendo das condições de estringência necessárias, estes valores devem ser sempre o ponto de partida para a otimização da hibridação.

Tabela 3.17- Condições ótimas de Temperatura, concentração de desnaturante e de NaCl previstos pelo modelo RSM para os vários desnaturantes testados.

Modelos	Condições ótimas			Intensidade de Fluorescência (a. u.)
	Temperatura (°C)	Desnaturante	NaCl (M)	
Formamida	62.6	14 (%)	5.1	2280.9
Ureia	50.1	4.1 (M)	5.1	3046.5
Etileno Carbonato	51.4	5.2 (%)	4.1	2574.3

4. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO

Aeromonas é uma bactéria altamente patogénica para peixes. Pode infetar uma grande variedade de peixes e tem, portanto, emergido como importante patogénico em aquacultura. A implementação de métodos rápidos que possam detetar atempadamente a presença desta bactéria pode representar uma enorme mais-valia na produção em aquacultura. Por esta razão, esta dissertação teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma nova sonda de LNA específica para o género *Aeromonas* para posterior aplicação num procedimento de FISH para deteção em alimentos.

A sonda construída para *Aeromonas* mostrou ser sensível, ou seja, foi capaz de detetar a várias estirpes de *Aeromonas* testadas. Apresentou também ótimas características em termos de afinidade para a deteção das sequências-alvo, já que o sinal de hibridação obtido foi extremamente forte. No entanto, apresentou limitações ao nível da especificidade, pois não foi possível eliminar completamente o sinal de hibridação cruzada com algumas espécies não-*Aeromonas* testadas. Ainda assim, as melhores condições de hibridação foram observadas a uma temperatura de 70°C e com o desnaturante Etileno carbonato usado na solução de hibridação.

Adicionalmente, os ensaios de otimização indicaram que existe uma relação muito forte entre a temperatura de hibridação, concentração salina (NaCl) e tipo de desnaturante usado. Avançou-se, portanto, para uma análise simultânea destas variáveis, com recurso à metodologia de RSM, de forma a estudar/prever o efeito destes parâmetros na hibridação de moléculas de LNA.

Foram selecionados três desnaturantes aplicados a técnicas de FISH: formamida, ureia e etileno carbonato. Dos três desnaturantes testados, a ureia permitiu obter uma eficiência máxima de hibridação de 3046 a.u., nas seguintes condições: temperatura de hibridação de 50°C, 5M de NaCl e concentração de Ureia de 4M. Os restantes desnaturantes proporcionaram sinais de hibridação inferiores. Para a formamida foi possível obter um sinal máximo de fluorescência de 2280 a.u. (condições ótimas: 62.6 °C, 5M de NaCl e 14% formamida) e no caso do etileno carbonato observou-se um valor de 2574 a.u. (condições ótimas: 51.4 °C, 4M de NaCl e 5% de etileno carbonato).

Os modelos quadráticos obtidos para o efeito de cada desnaturante foram submetidos a uma verificação de adequação do modelo, concluindo-se que os modelos para cada tipo de desnaturante são adequados para descrever a eficiência de hibridação pela superfície de resposta.

Ao longo deste trabalho, percebeu-se que a realização de mais experiências seria valiosa para complementar o estudo da presente dissertação. No entanto, devido às limitações de tempo e recursos materiais, algumas não foram possíveis de realizar. Por exemplo, seria desejável a realização de um ensaio em FISH das condições ótimas obtidas por RSM, de forma a validar o modelo proposto. Seria interessante a visualização dos sinais obtidos.

Relativamente à otimização da sonda para *Aeromonas* seria importante voltar novamente à otimização de forma a testar as condições ótimas obtidas no modelo e verificar o seu efeito na especificidade da sonda. Outra abordagem possível poderia passar pela utilização de uma sonda bloqueadora (“*Blocker probe*”) para evitar a ocorrência da hibridação cruzada com as estirpes não alvo. A sonda bloqueadora hibridaria com as sequências não alvo prevenindo estas sequências de estarem disponíveis para a ligação com a sonda *Aeromonas*. A competição entre as duas sondas asseguraria que cada sonda só se ligue aos alvos altamente complementares, aumentando assim a especificidade do ensaio.

Além disso também deveria ser efetuado uma avaliação de um protocolo para detecção de *Aeromonas* em amostras de peixe. Tal objetivo não foi abordado por não se ter conseguido uma otimização completa da sonda de LNA desenvolvida.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, M. A., & Alrozi, R. (2010). Optimization of preparation conditions for mangosteen peel-based activated carbons for the removal of Remazol Brilliant Blue R using response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, 165(3), 883–890. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2010.10.049>
- Ali, S. S., & Vidhale, N. N. (2013). Review Article Bacterial Siderophore and their Application: A review. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 2(12), 303–312.
- Alperi, A., Figueras, M. J., Inza, I., & Martínez-Murcia, A. J. (2008). Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *International Microbiology*, 11(3), 185–194.
- Amann, R., & Fuchs, B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature reviews. Microbiology*, 6(5), 339–48. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1888>
- Amann, R., & Ludwig, W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology - Amann - 2006 - FEMS Microbiology Reviews - Wiley.pdf, 24, 555–565.
- Anderson-Cook, C. M., Borror, C. M., & Montgomery, D. C. (2009). Response surface design evaluation and comparison. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 139(2), 629–641.
- Arora, S., Agarwal, R. K., & Bist, B. (2006). Comparison of ELISA and PCR vis-à-vis cultural methods for detecting *Aeromonas* spp. in foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 177–183.
- Ashelford, K. E., Weightman, A. J., & Fry, J. C. (2002). PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic acids research*, 30(15), 3481–3489.
- Austin, B., & Austin, D. A. (2012). *Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish* (Vol. 9789400748).
- Azevedo, N. F. (2005). *Survival of Helicobacter pylori in drinking water and associated biofilms*. University of Minho and University of Southampton.
- Balakrishna, K., Murali, H. S., & Batra, H. V. (2010). Detection of toxigenic strains of *Aeromonas* species in foods by a multiplex PCR assay. *Indian Journal of Microbiology*, 50(2), 139–144.
- Baş, D., Boyacı, İ. H., Baş, D., Boyacı, I. H., Baş, D., Boyacı, İ. H., Baş, D., et al. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836–845. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877405007843>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977.
- Bond, P. L., & Banfield, J. F. (2001). Design and Performance of rRNA Targeted Oligonucleotide Probes for in Situ Detection and Phylogenetic Identification of Microorganisms Inhabiting Acid Mine Drainage Environments. *Microbial ecology*, 41, 149–161. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032620>
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., & Neviani, E. (2006). Application of FISH technology for microbiological analysis: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

- Braasch, D. A., & Corey, D. R. (2001). Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chemistry & Biology*, 8(1), 1–7.
- Buller, N. B. (2014). *Bacteria and Fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*.
- Carvalho, M. J., Martínez-Murcia, A., Esteves, A. C., Correia, A., & Saavedra, M. J. (2012). Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *International Journal of Food Microbiology*, 159(3), 230–239. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.008>
- 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. Retrieved from <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/285/5/601>
- Cerqueira, L., Azevedo, N. F., Almeida, C., Jardim, T., Keevil, C. W., & Vieira, M. J. (2008). DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH). *International Journal of Molecular Sciences*, 9(10), 1944–1960.
- Chopra, a K., Houston, C. W., Peterson, J. W., & Jin, G. F. (1993). Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Canadian journal of microbiology*, 39(5), 513–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8330262>
- Christensen, H., Bisgaard, M., Frederiksen, W., Mutters, R., Kuhnert, P., & Olsen, J. E. (2001). Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? Proposal to modify Recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 Revision). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), 2221–2225.
- Cipriano, R. C., & Bullock, G. L. (2001). Furunculosis And Other Diseases Caused By. *Office*, 1–33.
- Daskalov, H. (2006). The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*, 17(6), 474–483.
- Demarta, A., Tonolla, M., Caminada, A. P., Ruggeri, N., & Peduzzi, R. (1999). Signature region within the 16S rDNA sequences of *Aeromonas popoffii*. *FEMS Microbiology Letters*, 172(2), 239–246.
- Dierckens, K. R., Vandenberghe, J., Beladjal, L., Huys, G., Mertens, J., & Swings, J. (1998). *Aeromonas hydrophila* causes “black disease” in fairy shrimps (Anostraca; Crustacea). *Journal of Fish Diseases*, 21(2), 113–119.
- Elayadi, A. N., Braasch, D. A., & Corey, D. R. (2002). Implications of high-affinity hybridization by locked nucleic acid oligomers for inhibition of human telomerase. *Biochemistry*, 41(31), 9973–9981.
- Esteve, C., Biosca, E. G., & Amaro, C. (1993). Virulence of *Aeromonas hydrophila* and some other bacteria isolated from European eels *Anguilla anguilla* reared in fresh water. *Diseases of Aquatic Organisms*, 16(1), 15–20. Retrieved from http://search.proquest.com/docview/16630985?accountid=14643&nhttp://mlbsfx.sibi.usp.br:3410/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:asfaaquaculture&atitle=Virulence+of+Aeromonas+hydrophila+and+some
- Esteve, C., Valera, L., Gutiérrez, C., & Ventosa, A. (2003). Taxonomic study of sucrose-positive *Aeromonas jandaei*-like isolates from faeces, water and eels: Emendation of *A. jandaei* Carnahan et al. 1992. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1411–1419.
- Eurostat. (2006). *Factos e números sobre a PCP - Dados básicos sobre a Política Comum da Pesca*. Retrieved from <http://ec.europa.eu/fisheries>

- Faisal, E. E. E. A. E. E. M. (2006). Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* from sea lamprey, *Petromyzon marinus* L., with skin lesions in Lake Ontario. *Journal of Fish Diseases*, 29(10), 618–622.
- FAO. (2010). The state of world fisheries and aquaculture. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010*, 218. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:THE+STATE+OF+WORLD+FISHERIES+AND+AQUACULTURE#0>
- FAO. (2014). *The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Vol. 2014). Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:THE+STATE+OF+WORLD+FISHERIES+AND+AQUACULTURE#0>
- Figueiredo, H. C. P., & Leal, C. A. G. (2008). Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(SPECIALISSUE), 8–14.
- Flegel, T. W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*, 258(1–4), 1–33.
- Fontenete, S., Barros, J., Madureira, P., Figueiredo, C., Jesper, W., & Azevedo, N. F. (2015). Mismatch discrimination in fluorescent *in situ* hybridization using different types of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(9), 3961–3969.
- Fontenete, S., Carvalho, D., Guimarães, N., Madureira, P., Figueiredo, C., Wengel, J., & Azevedo, N. F. (2016). Application of locked nucleic acid-based probes in fluorescence *in situ* hybridization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(13), 5897–5906. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-7429-4>
- Fontenete, S., Guimarães, N., Leite, M., Figueiredo, C., Wengel, J., & Azevedo, N. F. (2013). Hybridization-based detection of *Helicobacter pylori* at human body temperature using advanced Locked Nucleic Acid (LNA) probes. *PLoS ONE*, 8(11), 1–11.
- Fontenete, S., Guimarães, N., Wengel, J., & Azevedo, N. F. (2015). Prediction of melting temperatures in fluorescence *in situ* hybridization (FISH) procedures using thermodynamic models. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(December), 1–12. Retrieved from <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07388551.2014.993589>
- Fontenete, S., Leite, M., Guimarães, N., Madureira, P., Ferreira, R. M., Figueiredo, C., Wengel, J., et al. (2015). Towards fluorescence *in vivo* hybridization (FIVH) detection of *H. pylori* in gastric mucosa using advanced LNA probes. *PLoS ONE*, 10(4), 1–22.
- Gastalho, S., Silva, G. J., & Ramos, F. (2014). Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana : Impacto em saúde pública Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance : Health care impact. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 3, 29–45.
- Ghenghesh, K. S., Ahmed, S. F., El-Khalek, R. A., Al-Gendy, A., & Klena, J. (2008). *Aeromonas*-associated infections in developing countries. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2(2), 81–98.
- González-Rodríguez, M. N., Santos, J. A., Otero, A., & García-López, M. L. (2002). PCR detection of potentially pathogenic *aeromonads* in raw and cold-smoked freshwater fish. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 675–680.
- Gunst, R. F. (1996). Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. *Technometrics*, 38(3), 284–286.
- Heuer, O. E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., & Angulo, F. J. (2009). Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49(8), 1248–1253.
- Hiney, M., Dawson, M. T., Heery, D. M., Smith, P. R., Gannon, F., & Powell, R. (1992). DNA probe for *Aeromonas salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3), 1039–1042.

- Hirvelä-koski, V., Koski, P., & Niiranen, H. (1994). Biochemical properties and drug resistance of *Aeromonas salmonicida* in Finland. *Disease of Aquatic Organisms*, 20(3), 191–196.
- Igbinsosa, I. H., Igumbor, E. U., Aghdasi, F., Tom, M., & Okoh, A. I. (2012). Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–13.
- INE, I. P. (2015). *Estatísticas da Pesca 2014*.
- Jacobs, L., & Chenia, H. Y. (2007). Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology*, 114(3), 295–306.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35–73.
- Janda, J. M., Abbott, S. L., Khashe, S., Kellogg, G. H., & Shimada, T. (1996). Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(8), 1930–1933.
- Joseph, S. W., & Carnahan, A. (1994). The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annual Review of Fish Diseases*, 4(C), 315–343.
- Kannan, S., Suresh Kanna, P., Karkuzhali, K., Chattopadhyay, U. K., & Pal, D. (2001). Direct detection of diarrheagenic *Aeromonas* from faeces by polymerase chain reaction (PCR) targeting aerolysin toxin gene. *European review for medical and pharmacological sciences*, 5(3), 91–94.
- Khajanchi, B. K., Fadl, A. A., Borchardt, M. A., Berg, R. L., Horneman, A. J., Stemper, M. E., Joseph, S. W., et al. (2010). Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: Suggestive evidence of water-to-human transmission. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2313–2325.
- Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., et al. (1998). LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*, 54(14), 3607–3630.
- Kozińska, A., Figueras, M. J., Chacon, M. R., & Soler, L. (2002). Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 1034–1041.
- Kubota, K., Ohashi, A., Imachi, H., & Harada, H. (2006). Improved in situ hybridization efficiency with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probes. *Applied and environmental microbiology*, 72(8), 5311–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1538721&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Lawson, T. S., Connally, R. E., Vemulpad, S., & Piper, J. A. (2012). Dimethyl formamide-free, urea-NaCl fluorescence in situ hybridization assay for *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 263–266.
- Lehane, L., & Rawlin, G. T. (2000). Topically acquired bacterial zoonoses from fish: A review. *Medical Journal of Australia*.
- Lewbart, G. A. (2001). Bacteria and ornamental fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10(1), 48–56.
- Mandenius, C., & Brundin, a. (2008). REVIEW : BIOCATALYSTS AND BIOREACTOR DESIGN Optimization, Bioprocess Methodology, Using Design-of-experiments. *Biotechnol Progr*, 24, 1191–1203.
- Martinez-Murcia, A. J., Esteve, C., Garay, E., & Collins, M. D. (1992). *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS*

- Microbiology Letters*, 91(3), 199–206.
- Mateos, D., Anguita, J., Naharro, G., & Paniagua, C. (1993). Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. *The Journal of applied bacteriology*, 74(2), 111–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8444639>
- Matthiesen, S. H., & Hansen, C. M. (2012). Fast and non-toxic in situ hybridization without blocking of repetitive sequences. *PLoS ONE*, 7(7), 1–8.
- Morandi, A., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Graf, J., Morandi, A., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., et al. (2005). Evolutionary and Diagnostic Implications of Intragenomic Heterogeneity in the 16S rRNA Gene in *Aeromonas* Strains Evolutionary and Diagnostic Implications of Intragenomic Heterogeneity in the 16S rRNA Gene in *Aeromonas* Strains, 187(18), 6561–6564.
- Noga, E. . (1996). *Fish Disease: diagnosis and treatment*. St Louis.
- Oakey, H. J., Ellis, J. T., & Gibson, L. F. (1998). The development of random DNA probes specific for *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), 37–46.
- Ogara, W. O., Mbuthia, P. G., Kaburia, H. F. A., Sørum, H., Kagunya, D. K., Nduthu, D. I., & Colquhoun, D. (1998). Motile aeromonads associated with rainbow trout (*Onchoryncus mykiss*) mortality in Kenya. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 18(1), 7–9.
- Ørmen, Ø., Granum, P. E., Lassen, J., & Figueras, M. J. (2005). Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS*, 113(3), 203–207.
- Orozova, P., Barker, M., Austin, D. A., & Austin, B. (2009). Identification and pathogenicity to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), of some aeromonads. *Journal of Fish Diseases*, 32(10), 865–871.
- Peixoto, L. J. S., Sá, M. C. a, Gordiano, L. a, & Costa, M. M. (2012). *Aeromonas* Spp.: Fatores De Virulência E Perfis De Resistência a Antimicrobianos E Metais Pesados. *Arquivo Instituto Biologia*, 79(3), 453–461.
- Pidiyar, V. J., Jangid, K., Dayananda, K. M., Kaznowski, A., Gonzalez, J. M., Patole, M. S., & Shouche, Y. S. (2003). Phylogenetic affiliation of *Aeromonas culicicola* MTCC 3249(T) based on *gyrB* gene sequence and PCR-amplicon sequence analysis of cytolytic enterotoxin gene. *Systematic and applied microbiology*, 26(2), 197–202. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12866846>
- Porteen, K., Agarwal, R. ., & Bhilegaonkar, K. . (2007). Detection of *Aeromonas* sp. from chicken and fish samples by polymerase chain reaction. *American Journal of food Technology*, (2), 30–37.
- Priya, N. G., Pandey, N., & Rajagopal, R. (2012). LNA probes substantially improve detection of bacterial endosymbionts in whole mount of insects by fluorescent in-situ hybridization. *BMC Microbiology*, 12(1), 81. Retrieved from BMC Microbiology
- Rahman, M. A., Navarro, P., Kuhn, I., Huys, G., Swings, J., & Molby, R. (2002). Identification of the emergingskin pathogen *Corynebacterium amycolatum* usingPCR-. *Publicationslist.Org*, 68(2), 650–655. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?q=intitle:Identi+cation+and+Characterization+of+Pathogenic#0>
- Reith, M. E., Singh, R. K., Curtis, B., Boyd, J. M., Bouevitch, A., Kimball, J., Munholland, J., et al. (2008). The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC genomics*, 9(1), 427. Retrieved from <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-427>
- Robertson, K. L., & Thach, D. C. (2009). LNA flow-FISH: A flow cytometry-fluorescence in situ hybridization method to detect messenger RNA using locked nucleic acid probes. *Analytical Biochemistry*, 390(2), 109–114. Elsevier Inc. Retrieved from

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2009.04.026>

- Robertson, K. L., & Vora, G. J. (2012). Locked nucleic acid and flow cytometry-fluorescence in situ hybridization for the detection of bacterial small noncoding RNAs. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 14–20.
- Rocha, R., Santos, R. S., Madureira, P., Almeida, C., & Azevedo, N. F. (2016). Optimization of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) for the detection of bacteria: The effect of pH, dextran sulfate and probe concentration. *Journal of Biotechnology*, 226, 1–7. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.047>
- Rocklebank, J. . (1998). Ulcerative dermatitis caused by *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* in farmed Atlantic salmon in British Columbia, 39(February), 1998.
- Sanguin, H., Herrera, A., Oger-Desfeux, C., Dechesne, A., Simonet, P., Navarro, E., Vogel, T. M., et al. (2006). Development and validation of a prototype 16S rRNA-based taxonomic microarray for Alphaproteobacteria. *Environmental Microbiology*, 8(2), 289–307.
- Santos, R. S., Guimarães, N., Madureira, P., & Azevedo, N. F. (2014). Optimization of a peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) method for the detection of bacteria and disclosure of a formamide effect. *Journal of Biotechnology*, 187, 16–24. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.06.023>
- Sha, J., Pillai, L., Fadl, A. a, Galindo, C. L., Erova, T. E., & Chopra, A. K. (2005). The Type III Secretion System and Cytotoxic Enterotoxin Alter the Virulence of *Aeromonas hydrophila* The Type III Secretion System and Cytotoxic Enterotoxin Alter the Virulence of *Aeromonas hydrophila*, 73(10), 6446–6457.
- Shotts, E. B., Talkington, F. D., Elliott, D. G., & McCarthy, D. H. (1980). Aetiology of an ulcerative disease in goldfish *Carassius auratus* (L.): characterization of the causative agent. *Journal of Fish Diseases*, 3(2), 181–186. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2761.1980.tb00196.x>
- Silahtaroglu, A. N., Tommerup, N., & Vissing, H. (2003). FISHing with locked nucleic acids (LNA): Evaluation of different LNA/DNA mixmers. *Molecular and Cellular Probes*, 17(4), 165–169.
- Silva, G. F., Camargo, F. L., & Ferreira, A. L. O. (2011). Application of response surface methodology for optimization of biodiesel production by transesterification of soybean oil with ethanol. *Fuel Processing Technology*, 92(3), 407–413. Elsevier B.V. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2010.10.002>
- Søe, M. J., Møller, T., Dufva, M., & Holmstrøm, K. (2011). A sensitive alternative for microRNA in situ hybridizations using probes of 2'-O-methyl RNA + LNA. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 59(7), 661–672.
- Sousa, J. A. P., Romalde, J. L., Eiras, J. C., & March, R. (1997). characterization *Aeromonas* serological and molecular isolates *salmonicida* of of Portuguese and Alicia E . Toranzo2 Faculty of Sciences . University of Porto . 4050 , Porto . Portugal Department of Microbiology and Parasitology . 2 Faculty of Biology . Uni.
- States, U. (2001). Method 1605 : *Aeromonas* in Finished Water by Membrane Filtration using Ampicillin-Dextrin Agar with Vancomycin (ADA-V) October 2001, (October).
- Stender, H., Fiandaca, M., Hyldig-Nielsen, J. J., & Coull, J. (2002). PNA for rapid microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 48, 1–17.
- Sung, H. H., Hwang, S. F., & Tasi, F. M. (2000). Responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aeromonas* spp. *Journal of invertebrate pathology*, 76(4), 278–284.
- Válóczi, A., Hornyik, C., Varga, N., Burgyán, J., Kauppinen, S., & Havelda, Z. (2004). Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-

- modified oligonucleotide probes. *Nucleic acids research*, 32(22), e175. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=545470&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Varman, A. ., & Evans, M. . (1991). *Foodborne pathogens*.
- Ventura, M. T., & Grizzle, J. M. (1988). Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, 11(5), 397–407. Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2761.1988.tb00735.x>
- Vilas Boas, D., Almeida, C., Sillankorva, S., Nicolau, A., Azeredo, J., & Azevedo, N. F. (2016). Discrimination of bacteriophage infected cells using locked nucleic acid fluorescent in situ hybridization (LNA-FISH). *Biofouling*, 32(2), 179–190. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927014.2015.1131821>
- Vilches, S., Urgell, C., Merino, S., Chaco, M. R., Soler, L., Castro-escarpulli, G., Figueras, M. J., et al. (2004). Complete Type III Secretion System of a Mesophilic. *Society*, 70(11), 6914–6919.
- Villari, P., Pucino, A., Santagata, N., & Torre, I. (1999). A comparison of different culture media for the membrane filter quantification of *Aeromonas* in water. *Letters in Applied Microbiology*, 29(4), 253–257.
- Xin-hui, D., Srinivasakannan, C., Jin-hui, P., Li-bo, Z., & Zheng-yong, Z. (2011). Comparison of activated carbon prepared from *Jatropha* hull by conventional heating and microwave heating. *Biomass and Bioenergy*, 35(9), 3920–3926. Elsevier Ltd. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.06.010>
- Yamamoto, S., & Harayama, S. (1998). Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *ropD* and 16S rRNA genes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 813–819. Retrieved from http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=12&SID=X2yaF7HEvbRQTcfsElZ&page=1&doc=1
- Yáñez, M. A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M. J., & Martínez-Murcia, A. J. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 875–883.
- Yilmaz, L. S., & Noguera, D. R. (2004). Mechanistic Approach to the Problem of Hybridization Efficiency in Fluorescent In Situ Hybridization. *Society*, 70(12), 7126–7139.
- Yu, H. B., Zhang, Y. L., Lau, Y. L., Yao, F., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J. M., et al. (2005). Identification and Characterization of Putative Virulence Genes and Gene Clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134 / 91. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 4469–4477.

ANEXO I

Resultados do modelo para o ensaio 1

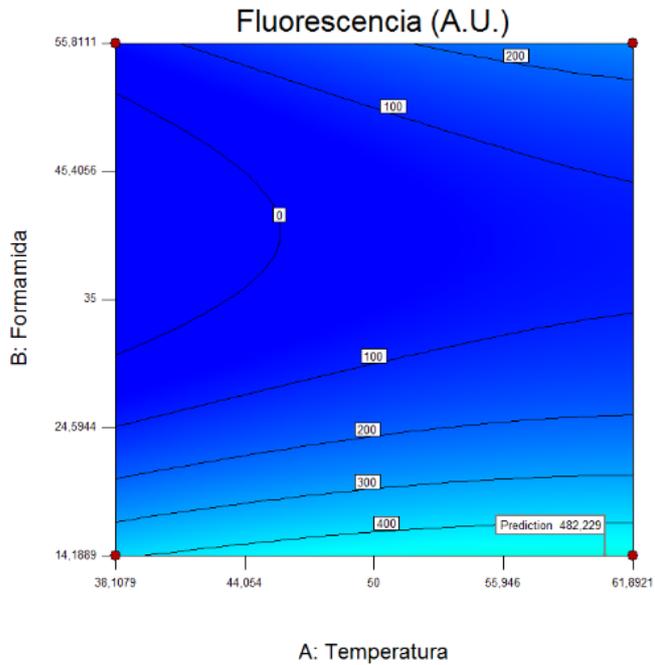


Figura 1- Gráfico de contorno correspondente á interação da temperatura com a Formamida na eficiência de hibridação

Resultados do modelo para o ensaio 2

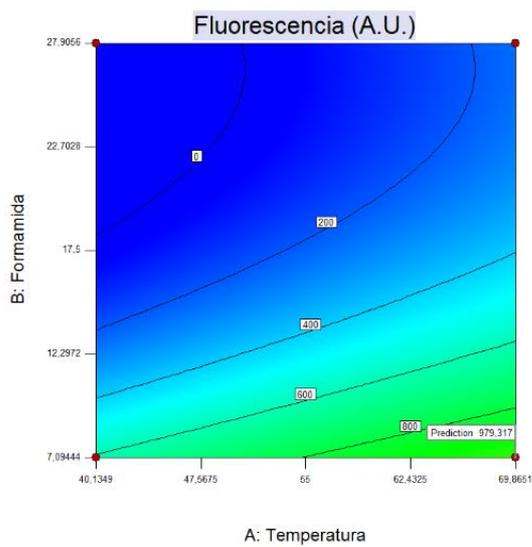


Figura 2- Gráfico de contorno correspondente á interação da temperatura com a Formamida na eficiência de hibridação

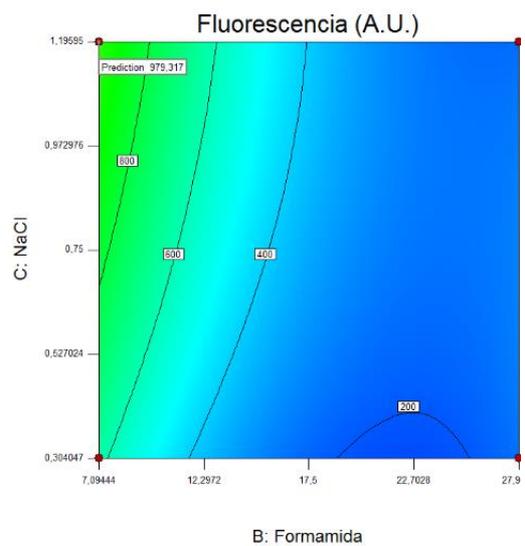


Figura 3- Gráfico de contorno correspondente á interação da Formamida com a concentração de NaCl na eficiência de hibridação

Resultados do modelo para o ensaio 3

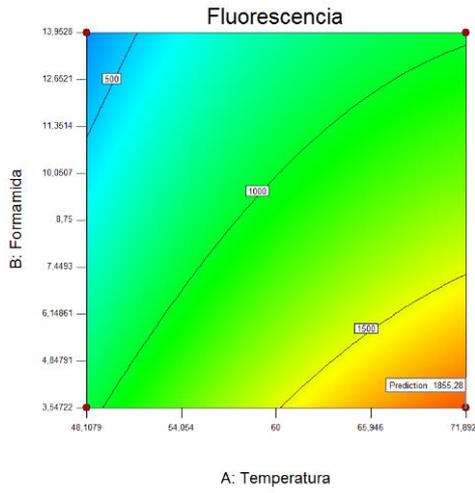


Figura 4- Gráfico de contorno correspondente á interação da temperatura com a Formamida na eficiência de hibridação

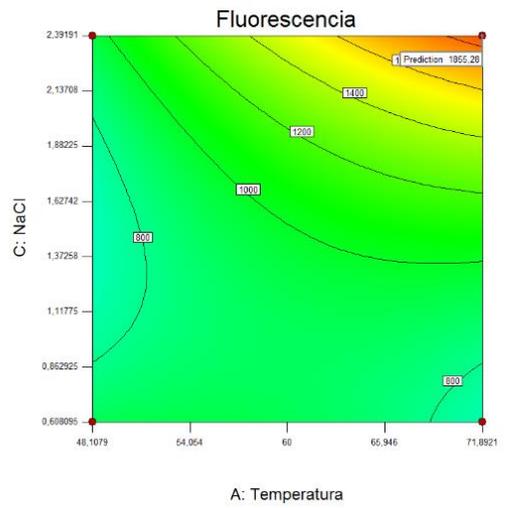


Figura 5- Gráfico de contorno correspondente á interação da temperatura com a concentração de NaCl na eficiência de hibridação

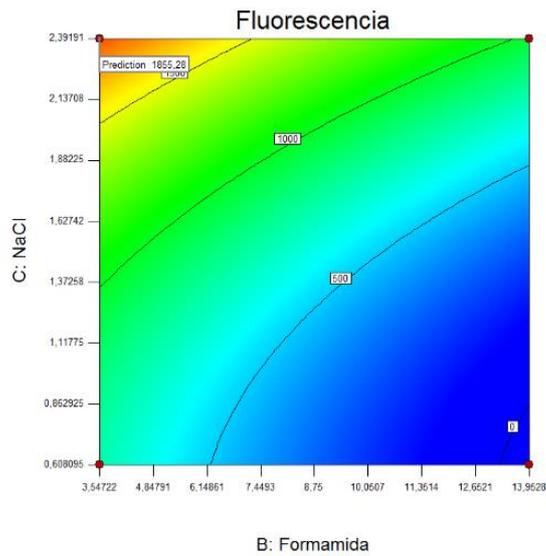


Figura 6- Gráfico de contorno correspondente á interação da Formamida com a concentração de NaCl na eficiência de hibridação