

INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CAMPUS PIÚMA  
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

**ERNESTO TAVARES BORGES NETO**

**FERRAMENTAS DE ANÁLISE MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
PATÓGENOS NA AQUICULTURA.**

Piúma  
2021

ERNESTO TAVARES BORGES NETO

**FERRAMENTAS DE ANÁLISE MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
PATÓGENOS NA AQUICULTURA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenadoria do Curso de Engenharia de Pesca  
do Instituto Federal do Espírito Santo, Campus  
Piúma, como requisito parcial para a obtenção do  
título de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Regina Spago de  
Camargo Gonçalves.

Piúma

2021

Dados internacionais de catalogação na publicação (CIP)

Bibliotecária responsável Ana Muller CRB6/ES 541

---

B732f Borges Neto, Ernesto Tavares, 1995-

Ferramentas de análise molecular para identificação de patógenos na  
aquicultura / Ernesto Tavares Borges Neto. -- 2021.

37 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves

Monografia (graduação) - Instituto Federal do Espírito Santo, Campus  
Piúma, Coordenadoria de Curso Superior de Engenharia de Pesca, 2021.

1. Organismos aquáticos – Patologia. 2. Aquicultura. 3. Diagnóstico  
molecular. I. Gonçalves, Flávia Regina Spago de Camargo. II. Instituto Federal do  
Espírito Santo, Campus Piúma. III. Título.

CDD: 639.8

---

ERNESTO TAVARES BORGES NETO

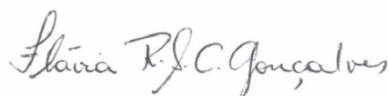
**FERRAMENTAS DE ANÁLISE MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DE  
PATÓGENOS NA AQUICULTURA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenadoria do Curso de Engenharia de Pesca  
do Instituto Federal do Espírito Santo, Campus  
Piúma, como requisito parcial para a obtenção do  
título de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Regina Spago de  
Camargo Gonçalves.

Aprovado em 26 de março de 2021.

**Banca examinadora:**



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves

Instituto Federal do Espírito Santo

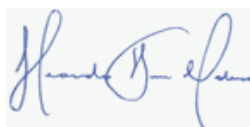
Orientadora



---

Prof. Dr. Henrique David Lavander

Instituto Federal do Espírito Santo



---

Prof. Dr. Leonardo Demier Cardoso

Instituto Federal do Espírito Santo

Piúma

2021

## **AGRADECIMENTO**

A minha família e amigos, pela amizade e por todo o apoio e incentivo.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo - Campus Piúma, seu corpo docente, direção, administração e todos os funcionários, pela oportunidade de cursar essa graduação.

A todos os professores, pelos ensinamentos e por todos os conselhos, durante essa trajetória.

A professora Dr. Flávia Regina Spago de Camargo Gonçalves, por me orientar com dedicação e paciência, obrigado por ter aceitado este desafio.

Aos meus colegas de curso, por compartilharem comigo vários momentos de descobertas e aprendizado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na minha formação, o meu muito obrigado.

## RESUMO

A aquicultura é um setor em crescente desenvolvimento no mundo, porém vem sofrendo muito com doenças causadas por patógenos. O diagnóstico e tratamento precoce desses organismos é essencial para evitar perdas por mortalidade nos sistemas de cultivo. O desenvolvimento da biologia molecular proporcionou o surgimento de ferramentas para realizar diagnóstico molecular de patógenos de forma mais eficiente do que os métodos convencionais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar, compreender e descrever as técnicas utilizadas para realizar diagnóstico molecular de patógenos na aquicultura. Foi realizada uma revisão sistemática em trabalhos sobre o tema nos últimos 10 anos. Algumas das ferramentas mais comuns utilizadas para a identificação de patógenos na aquicultura são a reação em cadeia da polimerase (PCR), a amplificação isotermal mediada por loop (LAMP), o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e a amplificação da recombinase polimerase (RPA). Essas ferramentas proporcionam resultados rápidos, com especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de diversas espécies de vírus, bactérias e fungos que afetam a aquicultura. Além da capacidade de detectar a presença de patógenos, essas ferramentas também podem ser usadas para diferenciar organismos em nível de espécies e também para identificar cepas. O desenvolvimento dessas ferramentas está em constante crescimento e possuem grande potencial para aplicação na aquicultura, porém ainda existe pouco material informativo e didático sobre as técnicas de diagnóstico molecular. Dessa forma, o incentivo para pesquisa e disseminação da informação dessas ferramentas pode ser um grande aliado do setor aquícola.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular, Patógeno, Cultivo de organismos aquáticos.

## **ABSTRACT**

Aquaculture is a continuously growing industry in the world, but it has been suffering a lot from diseases from pathogens. The early diagnosis and treatment of these pathogens are essential to avoid losses due to mortality in the cultivation systems. The development of molecular methods has led to the emergence of tools to perform molecular diagnosis of pathogens more efficiently than conventional methods. Therefore, the aim of this study is to investigate, understand and describe the techniques used to perform molecular diagnosis of pathogens in aquaculture. A systematic review was carried out on publications about the theme in the past 10 years. Some common tools for molecular diagnosis of pathogens in aquaculture are polymerase chain reaction (PCR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and polymerase recombinase amplification (RPA). These tools provide rapid, specific and sensitive diagnosis of several species of viruses, bacteria and fungi that affect aquaculture. In addition to the ability to detect the presence of pathogens, these tools can also be used to discriminate organisms at the species level and identify strains. The development of these tools is constantly growing and has great potential for application in aquaculture, however there is still little informational and didactic material on molecular diagnostic techniques. Thus, the promotion for research and information dissemination of these tools can be a great ally for aquaculture.

**Keywords:** Molecular diagnosis, Pathogens, Aquatic organisms cultivation.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AuNP - Sonda de nanopartículas de ouro.
- BIP - Backward Inner Primer.
- BKD - Doença bacteriana renal.
- Bst - DNA polimerase isolada do micro-organismo *Bacillus stearothermophilus*.
- cDNA - DNA complementar.
- DNA - Ácido desoxirribonucleico.
- dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados .
- EHP - *Enterocytozoon hepatopenaei*.
- FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.
- FIP - Forward Inner Primer.
- HPM - Microsporidiose hepatopancreática.
- IHHN - Necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa.
- IHNV - Vírus da necrose hematopoiética infecciosa.
- IMN - Mionecrose infecciosa.
- IPNV - Vírus da necrose pancreática infecciosa.
- ISAV - Vírus da anemia infecciosa do salmão.
- ITS - Espaçadores internos transcritos.
- LAMP - Loop-mediated isothermal amplification.
- LFD - Dispositivo de Lateral-Flow Dipstick.
- MgCl - Cloreto de magnésio.
- PCR - Reação em cadeia da polimerase.
- PF - Primer forward.
- PR - Primer backward.
- PvNV - *Penaeus vannamei* nodavirus.
- qLAMP - Loop-mediated isothermal amplification em tempo real.
- qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real.
- RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism.
- RNA - Ácido ribonucleico.
- rpoD - Subunidade D da RNA polimerase.
- RPA - Amplificação da recombinase polimerase.
- rpoD - Subunidade D da RNA polimerase.
- rRNA - RNA ribossomal.



RT - Transcriptase reversa.

SAV - Alphavirus salmonídeo.

SDV - Vírus da sleeping disease.

SSB - single-stranded DNA-binding.

SSU - Small subunit rDNA.

Ta - Temperatura de anelamento.

Tm - Temperatura de melting.

TS - Síndrome de taura.

VHSV - Vírus da septicemia hemorrágica viral.

WSSD - Síndrome da mancha branca.

WSSV - Vírus da síndrome da mancha branca.

YHD - Doença da cabeça amarela.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA DA PESQUISA .....</b>	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
4.1	DNA POLIMERASE .....	12
4.2	PRIMERS .....	12
4.3	TEMPERATURA .....	13
4.4	PCR .....	13
4.5	RFLP .....	15
4.6	LAMP .....	16
4.7	RPA .....	16
4.8	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....	17
4.9	PATÓGENOS .....	18
<b>4.9.1</b>	<b>Vírus .....</b>	<b>18</b>
<b>4.9.2</b>	<b>Bactérias .....</b>	<b>20</b>
<b>4.9.3</b>	<b>Fungos .....</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>VANTAGENS E DESVANTAGENS .....</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>26</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>27</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>28</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O setor pesqueiro mundial se mantém em crescimento e desenvolvimento ao passar dos anos. Atualmente, o pescado é o produto alimentício mais comercializado em todo o mundo, assim proporcionando alta demanda para os produtos provenientes da aquicultura, tornando o cultivo de organismos aquáticos um mercado em expansão. Em 2018, foi registrada a produção aquícola de 114.5 milhões de toneladas de pescado mundialmente, totalizando o movimento de 263,6 bilhões de dólares (FAO, 2020).

Aquicultura é a denominação da atividade que se propõe cultivar em ambientes controlados, organismos que possuem a água como meio em alguma etapa de seu desenvolvimento. Os principais organismos cultivados mundialmente na aquicultura são os peixes, moluscos, crustáceos e algas. Essa atividade tem potencial para um grande aumento na produção mundial de alimentos e é um forte aliado para lidar, de maneira sustentável, com a crescente demanda alimentar devido à alta taxa de crescimento populacional no mundo (SIQUEIRA, 2017; FAO, 2020).

Uma das principais barreiras que a produção aquícola atualmente enfrenta são os danos causados pelos surtos de doenças. Esse fator diminui o desenvolvimento do setor, causando prejuízos socioeconômicos como perda de empregos, redução de receita, insegurança alimentar, além de refletir efeitos em toda a cadeia produtiva. Estima-se que a aquicultura mundial apresenta perda total de aproximadamente seis bilhões de dólares por ano devido ao surgimento de doenças (LEUNG e BATES, 2013; WORLD BANK, 2014; STENTIFORD et al., 2017).

Os principais patógenos que afetam a aquicultura em geral são os vírus, bactérias, fungos e parasitas. A água é um excelente meio para esses organismos além de facilitar o transporte de um hospedeiro para outro, fazendo com que esse ambiente seja propício para ação desses agentes etiológicos (KUBITZA e KUBITZA, 2004; PAVANELLI et al., 2008).

A presença de patógenos na aquicultura pode comprometer o sucesso da atividade, onde as doenças causadas por esses agentes são capazes de reduzir a

lucratividade do sistema, causar altas despesas e até a falência do negócio devido à grande taxa de mortalidade durante os surtos. Além disso, o tratamento para eliminar a presença desses patógenos dos viveiros e reservatórios, podem gerar ainda mais custos e demanda de tempo com mão de obra especializada, produtos e manejo. A identificação e diagnóstico precoce da presença de patógenos na aquicultura é uma prática que pode auxiliar na mitigação de problemas causados por infecções e infestações desses organismos e evitar gastos futuros com remediação (TAVECHIO et al., 2009).

A biologia molecular é uma ciência que busca compreender o comportamento e interação dos sistemas que compõem as células. É o ramo da biologia que estuda as ações do DNA, RNA e síntese de proteínas, assim como a regulação de suas interações. Essa área utiliza ferramentas e metodologias para isolar, manejar e extrair informações ligadas ao material genético dos seres vivos (ALBERTS et al., 2017). Os avanços tecnológicos dessa área do conhecimento constantemente promovem descobertas inovadoras e possibilitam a humanidade a entender melhor o funcionamento da vida.

Análises moleculares são realizadas utilizando amostras de DNA ou RNA extraídas de amostras biológicas e água. Podem ser usadas para contagem, diagnóstico e diferenciação de patógenos e entre outros estudos relacionados ao código genético dos organismos (NONOHAY e HEPP, 2014). O desenvolvimento da tecnologia e crescimentos dos bancos de dados genéticos no mundo, tem facilitado e incentivado o uso de ferramentas para diagnóstico molecular de patógenos na aquicultura.

## **2 OBJETIVO**

Investigar, compreender e descrever as técnicas moleculares utilizadas para diagnóstico dos principais patógenos que afetam organismos cultivados na aquicultura.

## **3 METODOLOGIA DA PESQUISA**

Foi realizada uma pesquisa exploratória, por meio de uma revisão sistemática, a fim de identificar os principais métodos de biologia molecular utilizados para a identificação de patógenos na aquicultura nos últimos 10 anos.

A pesquisa bibliográfica foi realizada através das bases de dados: Periódicos Capes, Scielo (Scientific Electronic Library Online), Scopus, ResearchGate e Google Acadêmico. Foram utilizados como descritores: molecular diagnostic, aquaculture e disease. Assim, foram selecionados artigos, livros, resumos de congresso, teses e dissertações que abordassem sobre o uso de ferramentas de análise molecular no diagnóstico de patógenos na aquicultura, publicados entre os anos de 2010 e 2020. A partir da variável de interesse foram dispostos 65 trabalhos que compuseram o repertório teórico deste estudo, além do referencial complementar.

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

Os métodos convencionais utilizados para detecção de patógenos em geral se baseavam fundamentalmente em realizar o cultivo dos patógenos em condições *in vitro*, análises fenotípicas, sorológicas ou análises histológicas do tecido afetado. Por muito tempo essas técnicas foram os principais meios de estudar, entender e detectar organismos patogênicos (WAGENER, 1997). Porém, essas metodologias são complexas, geralmente consomem bastante tempo, necessitam de atenção e precisão, e em muitos casos a experiência do manipulador influencia bastante no sucesso dos resultados.

Com a evolução das ciências biológicas, começou-se a aplicar os conhecimentos sobre DNA e RNA na compreensão dos processos de manifestação de doenças, esse conceito é denominado metodologia molecular. A partir daí já era possível realizar análises mais detalhadas envolvendo as expressões genéticas das células e obter resultados mais confiáveis e consistentes sobre os organismos relacionando seus fenótipos e genótipos (ALBERTS et al., 2017).

Até esse ponto, o campo da biologia molecular ainda enfrentava dois grandes problemas, sendo eles a pequena quantidade de ácidos nucleicos no material a ser analisado e a baixa especificidade dos trechos de interesse que era possível isolar. Contudo, em 1983, o químico Kary Mullis desenvolveu a técnica denominada de Amplificação em Cadeia da Polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) que é capaz de amplificar em milhares de vezes uma região específica de uma amostra de DNA. Com isso, a biologia molecular recebeu uma ferramenta considerada indispensável para pesquisas e análises referentes ao código genético (ZAHA et al., 2012).

Em geral, as técnicas utilizadas para diagnósticos moleculares hoje em dia se baseiam na tentativa de amplificar um trecho específico do código genético de um organismo e detectar e/ou quantificar essa amplificação. Essas técnicas necessitam de três fatores importantes para seu funcionamento: a enzima DNA polimerase, os primers e a temperatura (RAMSDEN, 2009; LIMA 2008).

#### 4.1 DNA POLIMERASE

A DNA Polimerase é uma enzima responsável pela síntese de moléculas de DNA a partir de dNTP's (desoxirribonucleotídeos fosfatados). Ela é essencial para a amplificação do DNA, tendo ela a função de adicionar os nucleotídeos, um a um, à nova fita que irá ser formada a partir da fita molde (RYE et al., 2016).

A enzima mais comum utilizada na PCR é a Taq DNA Polimerase. Ela recebe esse nome pois é uma enzima isolada da bactéria *Thermus aquaticus*. Esse micro-organismo vive em ambientes com temperaturas acima de 70°C, fazendo com que sua enzima polimerase tenha um desempenho ideal para ser usada na PCR, que atua ciclicamente em altas temperaturas (RAMSDEN, 2009).

A DNA polimerase só atua em moléculas dupla fita. Para realizar a amplificação de material genético a partir de moléculas de RNA, é necessário primeiramente efetuar uma etapa de transcriptase reversa (reverse transcriptase - RT). Essa etapa consiste em adicionar a enzima RT na solução contendo RNA, essa enzima é capaz de fazer o processo de transcrição do RNA para DNA complementar (cDNA). Após esse processo de síntese, é possível utilizar o cDNA formado na realização das técnicas de amplificação de material genético (GERARD et al., 1997; ARTIKA et al., 2020).

#### 4.2 PRIMERS

Os primers são sequências curtas de nucleotídeos (oligonucleotídeos) sintetizados artificialmente e agem especialmente em um determinado trecho do DNA alvo. Os primers são os componentes que garantem toda a especificidade dos diagnósticos moleculares em geral. São desenvolvidos para se ligar a região de interesse do DNA onde a polimerase irá se iniciar. Em uma PCR convencional são utilizados dois primers chamados de *forward* (atua na porção 5'-3') e *reverse* (atua na porção 3'-5'). Geralmente os primers possuem um tamanho de 20 nucleotídeos de comprimento. Esse tamanho já é o suficiente para garantir uma probabilidade estatística confiável em que o primer irá se anelar somente ao trecho desejado. Em experimentos com primers maiores é possível começar a ser identificado a ocorrência do fenômeno de auto-anelamento (dímero de primer ou self-annealing), onde um primer se liga à uma

porção de si mesmo ou em outro primer. Para se desenvolver um primer, é necessário definir algumas características para garantir sua eficiência, como tamanho, temperatura de atuação, proporção de guanina-citosina e repetição de bases nitrogenadas. A elaboração de um primer pode ser a parte mais importante para a amplificação em cadeia, e geralmente possui uma complexidade para sua definição, porém, existem alguns algoritmos como Primer3 (Untergasser et al., 2012) e PrimerQuest™ que podem ser utilizados para auxiliar nessa etapa (VAN PELT-VERKUIL et al., 2008; RAMSDEN, 2009; ZAHA et al., 2012).

#### 4.3 TEMPERATURAS

A temperatura é uma variável fundamental para a amplificação molecular. Sua atuação basicamente tem influência em todas as etapas desse processo. É ela a responsável por ativar a enzima polimerase e os primers, e também pela desnaturação do DNA. Conhecer as temperaturas ótimas para cada etapa da amplificação e como deve ser aplicada em cada tipo de processo diferente é essencial para o sucesso do procedimento (CHESTER et al., 1993; SCHORDERET, 1994). A temperatura de melting (melting temperature -  $T_m$ ) é a temperatura onde a solução possuirá metade das fitas de DNA desnaturadas e a outra metade pareada, e a temperatura de pareamento (annealing temperatura -  $T_a$ ) é a temperatura onde ocorre a ligação entre primer e fita simples (CHESTER et al., 1993). Essas variáveis são levadas em questão para definição e construção de um primer e para realizar análises quantitativas da amplificação.

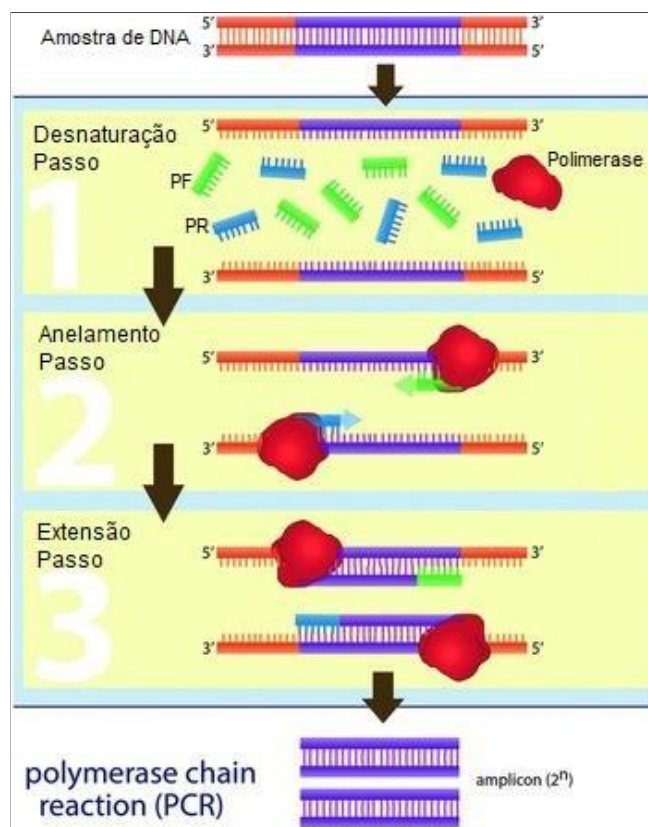
#### 4.4 PCR

A PCR é capaz de realizar a amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA específicos, que rapidamente pode ser concluída mesmo que com uma quantidade muito pequena de DNA alvo. Além dos componentes DNA Polimerase e Primers, é necessário adicionar à reação os componentes dNTPs e um cofator para a DNA Polimerase (geralmente é utilizado o cloreto de magnésio MgCl). O processo de amplificação em cadeia se baseia em realizar ciclos repetitivos de três passos, sendo eles a desnaturação, anelamento e extensão (Figura 1). Na desnaturação a temperatura da solução é elevada entre 94°C e 96°C, é onde as moléculas dupla fita



de DNA se desfazem a partir do rompimento das ligações de ponte de hidrogênio entre elas, se tornando moléculas fita simples. Em seguida, na etapa de anelamento ocorre a ligação dos primers nos trechos específicos das fitas simples do DNA alvo, a temperatura é reduzida até a temperatura ótima de atuação dos primers particulares da reação, podendo ser geralmente entre 30°C e 60°C. Por último acontece a polimerização das novas moléculas pela DNA polimerase na etapa de extensão, em que a temperatura é elevada até por volta de 72°C e 75°C, na qual as enzimas se associam aos primers anelados às fitas simples e a partir desse ponto se inicia o processo de amplificação (MCPHERSON et al., 1991; LIMA, 2008).

Figura 1 - Esquemática das etapas da PCR. PF: Primer forward. PR: Primer reverse.



Fonte: Adaptado de Hui et al., 2015.

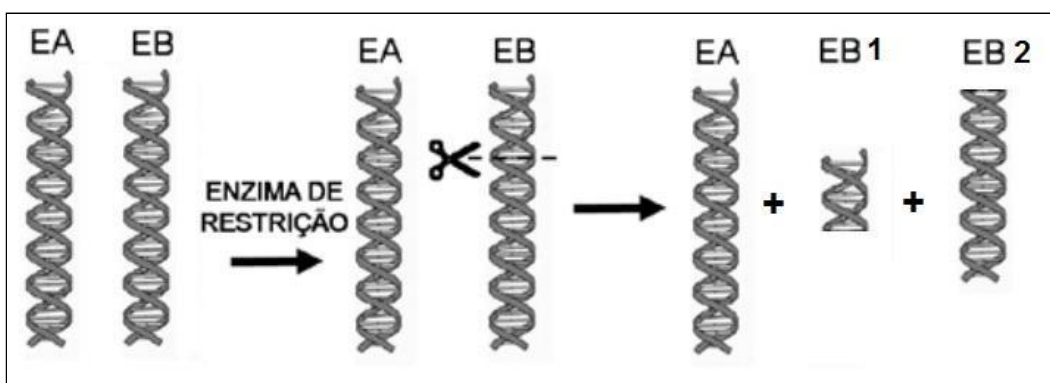
Esse processo é repetido ciclicamente várias vezes, onde ao final de cada ciclo o número de moléculas alvo na solução é dobrado. Geralmente o equipamento utilizado para as variações de temperatura é o termociclador. Uma reação de PCR pode ter duração média de duas a quatro horas, realizando em média 30 ciclos,

onde ao final pode-se obter bilhões de cópias da região de interesse a partir de poucas moléculas de amostra (LIMA, 2008).

#### 4.5 RFLP

O polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) é um procedimento que pode ser utilizado nos produtos da PCR como alternativa para o diagnóstico ou diferenciação de espécies. A RFLP consiste em adicionar ao produto amplificado da PCR, uma enzima endonuclease de restrição que é capaz de reconhecer um trecho específico do DNA alvo e cortá-lo (clivar) naquele ponto, dividindo um pedaço de DNA em duas partes de tamanhos diferentes (Figura 2). Posteriormente, é possível detectar se houve ou não a ação da clivagem no DNA alvo por eletroforese em gel, observando a relação de moléculas de tamanho diferente na solução (PAVAN E MONTEIRO, 2014).

Figura 2 - Atividade da enzima endonuclease de restrição na identificação e clivagem de uma molécula de DNA alvo. EA: Molécula não-alvo; EB: Molécula alvo; EB1: Fragmento menor da molécula alvo; EB2: Fragmento maior da molécula alvo.



Fonte: Adaptado de Pavan e Monteiro, 2014.

#### 4.6 LAMP

É uma técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (Loop-mediated isothermal amplification - LAMP). Assim como a PCR, esse método também realiza amplificação de DNA a partir de um trecho específico. Porém, a LAMP tem o diferencial de ser mais rápida, ter mais especificidade e ser conduzida sem oscilação

de temperatura. Além disso, essa técnica utiliza dois pares de primers distintos sendo eles os primer internos FIP (Forward Inner Primer) e BIP (Backward Inner Primer), e dois primers externos F3 e B3. Outra diferença é que na LAMP normalmente se utiliza de outra DNA polimerase chamada de Bst (isolada do organismo *Bacillus stearothermophilus*) (NOTOMI et al., 2000).

Para se iniciar o processo da LAMP, primeiro é necessário elevar a temperatura da solução até 95°C por aproximadamente cinco minutos para que ocorra a desnaturação inicial das fitas duplas para fitas simples, após essa etapa todo o processo da LAMP ocorre isotermicamente em aproximadamente 65°C. O funcionamento dessa técnica pode ser dividido em três momentos chave, sendo eles a Produção inicial do alvo, Ciclagem/amplificação e Elongamento/reciclagem (NOTOMI et al., 2000).

#### 4.7 RPA

A amplificação de polimerase por recombinase (recombinase polymerase amplification - RPA) é uma técnica recente de amplificação isothermal de DNA. A RPA também utiliza pares de primer e enzimas DNA polimerase, seu grande diferencial é a exploração da ação de outra enzima chamada recombinase. As recombinases se unem aos primers formando um complexo molecular capaz de identificar as sequências alvo do DNA, podendo se parear em sequências de fita dupla. Em seguida, uma proteína chamada SSB (single-stranded DNA-binding) se liga à região do pareamento estabilizando a ligação dos primers, onde a polimerase inicia o processo de síntese. Uma outra diferença da RPA é a possibilidade de realizar transcrição reversa de RNA para cDNA durante a amplificação, apenas adicionando a enzima RT junto da solução, sem necessitar de uma etapa anterior apenas para isso (PIEPENBURG, 2006; JAMES e MACDONALD, 2015).

#### 4.8 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Existem diversas metodologias para observar os resultados de uma amplificação, porém as mais utilizadas são a realização de eletroforese em gel e a adição de sondas fluorescentes na solução.

A eletroforese em gel consiste em separar as moléculas de uma solução a partir do seu tamanho. A solução é induzida por uma diferença de potencial fazendo com que as moléculas sejam transportadas através de uma matriz de gel (geralmente agarose ou poliacrilamida), dependendo do tamanho da molécula, ela irá desenvolver uma velocidade diferente pela matriz, onde as moléculas maiores são mais lentas e as moléculas menores são mais rápidas. Dessa forma, ao final da indução, é formado uma coluna com diversas células contendo um aglomerado de moléculas de mesmo tamanho (SOUZA, 2003). A aplicação dessa técnica permite detectar se houve a amplificação de DNA observando se há presença de moléculas do tamanho do trecho alvo na solução.

Um significativo avanço para o diagnóstico de patógenos por amplificação de DNA foi o desenvolvimento da PCR em tempo real. Essa técnica, também chamada de PCR quantitativo (qPCR), consiste em adicionar um componente fluorescente à solução que irá emitir luz quando detectar a ocorrência da amplificação do material genético. Os dois componentes mais utilizados nos processos de diagnóstico em tempo real são a SYBR-Green I ® e a TaqMan®. A SybrGreen é um agente intercalante que se liga inespecificamente a moléculas de DNA dupla fita, emitindo luz proporcionalmente à quantidade de DNA presente na solução. Porém, esse agente pode se ligar a qualquer DNA dupla fita, inclusive dímeros de primers ou até contaminantes, podendo gerar em certos casos resultados falso positivos. Já a TaqMan é uma sonda (oligonucleotídeo) específica ao DNA alvo, similar a um primer. Ela é desenvolvida para se ligar somente a um certo trecho do DNA que irá ser replicado, e quando a Taq DNA Polimerase encontra essa sonda na fita durante a síntese ela a degrada. Os componentes resultantes da degradação da TaqMan têm a capacidade de emitir luz, fazendo com que essa emissão agora seja proporcional à quantidade de DNA amplificado. Outra característica da TaqMan é a capacidade de serem projetadas para emitir diversas faixas de luz diferentes, possibilitando assim, realizar e detectar em uma mesma solução à amplificação de diversas amostras de DNA distintos, essa técnica é chamada de Multiplex (CAVALCANTI et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2010).

## 4.9 PATÓGENOS

### 4.9.1 Vírus

Os vírus são considerados os organismos em maior abundância no ecossistema aquático e também essenciais para seu equilíbrio. Por isso, o estudo e entendimento desses seres são importantes alavancadores no avanço tecnológico da aquicultura marinha e continental (FUHRMAN, 1999; JACQUET et al., 2010). Nos últimos anos as ferramentas de biologia molecular têm oferecido grande suporte para entender e controlar esses agentes (JACQUET et al., 2010; LI et al., 2019).

Esses micro-organismos podem possuir diversas características na organização do seu genoma, podendo apresentar DNA ou RNA sendo eles em fita-dupla ou fita-simples (CANN, 2014). Para a detecção de vírus com RNA é necessário primeiramente realizar a síntese de cDNA através da transcrição reversa RT, pois ele não é um bom receptor para a Taq DNA polimerase (ARTIKA et al., 2020). A aplicação da RT para realização da PCR é denominada de RT-PCR.

O desenvolvimento e aplicação de metodologias moleculares têm impulsionado o avanço da compreensão, manejo e controle na epidemiologia dos principais vírus patógenos de salmonídeos como alphavirus salmonídeo (SAV), vírus da anemia infecciosa do salmão (ISAV) e vírus da septicemia hemorrágica viral (VHSV) (SNOW, 2011). O estudo dessas doenças tem recebido bastante atenção e novos ensaios, métodos e estudos utilizando variantes da PCR no diagnóstico de SAV (BRACELAND et al., 2017; SHI et al., 2017; WELI et al., 2021; TEIGE et al., 2020), ISAV (PURCELL et al., 2018) e VHSV (PIERCE et al., 2013) têm mostrado resultados positivos.

No Arquipélago Shetland, Escócia, foi possível detectar a presença de SAV nos peixes selvagens Solha escura (*Limanda limanda*), Solha-Americana (*Hippoglossoides platessoides*) e Solha europeia (*Pleuronectes platessa*), em amostras de tecido do coração e rim através do PCR em tempo real que teve como alvo o gene nsP1. Esse estudo foi capaz de levantar informações importantes para a

discussão sobre a origem da SAV na aquicultura de salmonídeos (SNOW et al., 2010).

Pinheiro et al. (2016) desenvolveu um ensaio de multiplex RT-PCR, que é capaz de simultaneamente detectar quatro principais agentes virais da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), sendo eles, vírus da necrose pancreática infecciosa (IPNV), vírus da necrose hematopoiética infecciosa (IHNV) e sleeping disease virus (SDV). Pela primeira vez foi registrado co-infecção de VHSV/SDV e IHNV/SDV na truta arco-íris.

As principais doenças que afetam os camarões na aquicultura no mundo são doença da síndrome da mancha branca WSSD, doença da cabeça amarela (YHD), síndrome de taura (TS), necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa (IHHN) e mionecrose infecciosa (IMN), todas essas causadas por vírus. Ainda hoje a PCR tem sido muito utilizada como técnica de diagnóstico para essas doenças (OIE, 2019; RAJA, et al., 2016; RAJENDRAN, et al. 2016).

Novos kits para detecção de vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) em camarões tiveram resultados positivos no Reino Unido, utilizando técnicas baseadas em PCR com o intuito de ser possível realizar o diagnóstico localmente, assim que preciso, com resultados rápidos e eficientes e sem necessidade de laboratórios especializados (TSAI et al., 2012; MINARDI et al., 2019). Bandeira (2016), teve sucesso na identificação de WSSV em camarão *Palaemon pandaliformis* e moluscos *Pomacea lineata* e *Melanoides tuberculatus*, no Rio Paraíba, no Vale do Paraíba – PB, Brasil, utilizando a técnica LAMP, que pode ser concluída em torno de duas horas, desde a extração do DNA à análise por eletroforese em gel. A técnica LAMP quando comparada com a PCR se mostra mais rápida, sensível, estável e possui mais especificidade, além disso, também é considerada mais barata por não necessitar de aparelhos sofisticados, sendo necessário certas vezes apenas da aplicação de banho-maria (DHAMA et al., 2014). Govindaraju et al. (2020), cita novas técnicas de diagnóstico da WSSV sendo estudadas que utilizam nanotecnologia e apresentam potencial na detecção, prevenção e tratamento da doença na aquicultura.

A técnica LAMP vem ganhando espaço devido suas inúmeras vantagens comparada à PCR, fazendo com que nos últimos anos a aplicação e melhoria desse método venha recebendo mais atenção. Contudo, os métodos utilizados para detecção da amplificação da LAMP em sua maioria são por aplicação de técnicas simples como eletroforese ou adição de agentes fluorescentes como SYBR Green e sondas TaqMan. Para tanto, a avaliação de técnicas alternativas a essas tem surgido bastante e com bons resultados, com promessas de reduzir o tempo e simplificar o processo.

Khunthong et al. (2013), desenvolveram um método para detecção do vírus da doença da cabeça amarela (YHD) a partir do produto da técnica LAMP, utilizando um dispositivo de Lateral-Flow Dipstick (LFD), que consiste em detectar a presença de uma molécula alvo em uma amostra líquida deslocada lateralmente em um fluxo laminar. O dispositivo LFD é um aparelho portátil e capaz de gerar resultados rápidos, fáceis de interpretar e com custo menor comparado às técnicas convencionais.

Suebsing et al. (2013), elaborou um ensaio para detecção de *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV) combinando a técnica LAMP com sondas contendo nanopartículas de ouro (gold nanoparticles probe - AuNP). Esse método proporciona a detecção visual para diagnóstico positivo (solução com coloração vermelha) e negativo (solução com coloração azul) de PvNV na amostra, que proporciona um ganho significativo de tempo além de apresentar baixo custo para aplicação. Essa técnica se mostrou promissora para detecção simples e rápida para doenças de organismos na aquicultura.

#### **4.9.2 Bactérias**

Grande parte dos micro-organismos patogênicos que afetam a produção na aquicultura mundial são bactérias. Uma grande parcela da comunidade científica da biologia molecular se dedica ao estudo desses micro-organismos (FRANS et al., 2011; BIRKBECK et al., 2011). As bactérias estão presentes em todos os tipos de ambientes e sobrevivem bem no meio aquático. O grande crescimento da aquicultura mundial levou a ocorrência de vários surtos de doenças causadas por

bactérias, resultando em perdas bilionárias por todo o mundo, provocando um incentivo para o entendimento e controle desse grupo (PRIDGEON e KLESIUS, 2012).

As bactérias em geral possuem duas estruturas responsáveis por conter suas informações genéticas, são elas o cromossomo bacteriano, também chamado de nucleóide, e os plasmídeos. Ambos são moléculas de DNA dupla fita geralmente circular, onde o nucleóide possui genes responsáveis pela síntese de proteínas essenciais para a célula e os plasmídeos são bem menores e contém apenas genes que codificam proteínas relacionadas à alguma vantagem adaptativa como por exemplo resistência a certos antibióticos (SHAKIBAIE, 2009).

As vantagens que as técnicas de diagnóstico molecular apresentam tem atraído os olhares de profissionais da área da microbiologia. Os resultados que a PCR e suas variantes vem demonstrando, só reforçam a ideia de sua capacidade de ser altamente sensível e prática (AUSTIN e AUSTIN, 2016).

Em particular, o estudo da *Aeromonas salmonicida* nos últimos anos recebeu bastante atenção. A aplicação e desenvolvimento de ensaios de PCR em tempo real para a detecção desse organismo vem sendo muito comum (KEELING et al., 2013; BARTOKOVA et al., 2017). Fernandez-Alvarez et al. (2016) e Du et al. (2017) foram os primeiros a registrar o uso dessa técnica para detecção de *A. salmonicida* utilizando SYBR green I, ambos apresentando como resultado alta especificidade e velocidade de detecção.

O gênero *Aeromonas* possui um total de 36 espécies catalogadas (GRAF, 2015). Borrell et al. em 1997, foram os primeiros a aplicar a técnica de polimorfismo de comprimentos de fragmentos de restrição (RFLP) em conjunto à PCR para diferenciar espécies de *Aeromonas*. Esse método se baseava em aplicar a RFLP utilizando o gene 16S rRNA, que é uma subunidade dos ribossomos de procariontes que apresenta baixa taxa de evolução no gene, havendo assim bastante utilidade em estudos de filogenética. Posteriormente muitos trabalhos similares foram publicados utilizando ainda esse mesmo gene para diferenciação de *Aeromonas* (GRAF, 1999; FIGUERAS et al., 2000; GHATAK et al., 2007; LEE et al., 2002).



Recentemente Pua et al. (2018), desenvolveu um ensaio de PCR-RFLP para diferenciação das espécies desse gênero, porém, utilizou como alvo o gene de manutenção *rpoD* (RNA polymerase D subunit) que foi capaz de diferenciar 27 espécies de *Aeromonas*. Os autores afirmam que o uso do *rpoD* como alvo pode ser uma alternativa rápida, confiável e menos trabalhosa para o gene 16S rRNA.

Os genes do RNA ribossômico nos procariontes, assim como nos eucariontes, possuem regiões altamente conservadas que possuem potencial para identificar e classificar bactérias que não são cultiváveis em condições *in vitro* (SHARMA, 2005; LEE, 2016; DONG, 2017). Entretanto, esse método pode não ser eficaz na tentativa de diferenciação de espécies muito próximas, pois apresentam similaridade quase idêntica dessa sequência genética, assim como em algumas espécies de *Vibrio* (GOMEZ-GIL et al., 2004; THOMPSON et al., 2009).

O uso de DNA de plasmídeos pode ser capaz de auxiliar na diferenciação de grupos de organismos muito próximos. Schikorski et al (2013) desenvolveram um ensaio de PCR em tempo real sensível apenas para *Vibrio harveyi* em contraste com outras espécies próximas (*Vibrio brasiliensis*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio mytili*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio coralliilyticus*) extraídos de abalone *Haliotis tuberculata*. Utilizando em conjunto outro par de primer que possui como alvo o plasmídeo pVCR1, foi possível detectar a cepa ORM4 de *V. harveyi* diferenciando de outras como LEM/07/001, LEM/07/004, LEM/07/012 e LEM/07/013. Segundo Travers (2008), só há registros da presença do plasmídeo pVCR1 na cepa específica ORM4 patógena para *H. tuberculata*.

O uso da PCR em tempo real tem apresentado ser muito eficaz na identificação de *Vibrio* em moluscos. McCleary e Henshilwood (2015), reproduziu a técnica para detectar *Vibrio aestuarianus* em ostra-do-pacífico (*Crassostrea gigas*) e Bidault et al. (2015) realizou a mesma metodologia para detectar *Vibrio tapetis* em berbigão *Venerupis philippinarum*. Esses moluscos estão entre as espécies mais importantes cultivadas na aquicultura mundialmente (WIJSMAN et al., 2019) e o poder de controle de patógenos que os diagnósticos moleculares proporcionam, junto com sua praticidade, velocidade e baixo custo, são grandes aliados para o desenvolvimento econômico dessa área no mundo.

Modelos de diagnóstico molecular isotermiais como exemplo a LAMP tem mostrado ser os favoritos nos laboratórios que realizam essas análises, principalmente pelo fato de não necessitarem de termocicladores (CRAW e BALACHANDRAN, 2012). Nos últimos anos, a RPA que também opera isotermicamente, está sendo bastante usada para diagnóstico de bactérias. Pang et al. (2019), foram os primeiros a desenvolver uma metodologia de RPA para detecção de *V. harveyi*, segundo os autores todo o processo durou cerca de vinte minutos, com bons resultados de sensibilidade, prometendo alta viabilidade para controle do patógeno na aquicultura. A mesma técnica foi otimizada para detectar a presença de *V. parahaemolyticus*, o ensaio apresentou ótimos resultados quando aplicado em amostras de molusco chinês (*Sinoavacula constricta*), mexilhão (*Mytilus edulis*), *Scapharca subcrenata*, molusco preto (*Cyclina sinensis*) e berbigão (*Venerupis philippinarum*), a análise teve duração de trinta minutos e promete bom desempenho para o diagnóstico quando se tem pouco recurso disponível (ZHU et al., 2018). A RPA também possui potencial para controle e segurança de alimentos, sua aplicação obteve bons resultados detectando presença de *V. vulnificus* em amostras de frutos do mar frescos infectados, com tempo de análise entre 2 e 14 minutos (YANG et al., 2020).

A técnica de RPA além de isotérmica, possui uma faixa de temperatura bem baixa para iniciar a reação, geralmente entre 35°C e 40°C (PIEPENBURG et al. 2006). Essa característica reduz ainda mais os custos de operação da análise. Porém, a RPA é relativamente nova e possui uma baixa especificidade para diferenciar sequências muito parecidas, podendo resultar em altas taxas de falsos positivos e negativos nesses casos (DAHER et al., 2015; ZOU et al., 2020).

Para realizar análises Multiplex, as técnicas PCR e LAMP ainda são as mais utilizadas. Yu et al. (2013) obtiveram sucesso ao desenvolver um ensaio de LAMP para trabalhar com três espécies de *Vibrio* em uma mesma reação, onde sua metodologia foi capaz de detectar simultaneamente *V. harveyi*, *Vibrio anguillarum* e *V. alginolyticus* com sensibilidade  $10^3$  vezes maior que PCR. A técnica multiplex para diagnóstico simultâneo de bactérias pode apresentar resultados tão bons quanto às análises individuais convencionais (KIM et al. 2014; CHAPELA et al., 2018).

Utilizando uma técnica chamada microarranjo de DNA, em conjunto à PCR, foi possível discriminar simultaneamente oito patógenos de peixes (*Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Lactococcus garvieae*, *Photobacterium damsela*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Streptococcus iniae* e *V. anguillarum*) (CHANG et al., 2012). Esse modelo consiste em quantificar e diferenciar moléculas alvo marcadas com sondas amplificadas por PCR, assim sendo possível detectar vários patógenos ao mesmo tempo (YOO e LEE, 2008). Porém, essa técnica necessita de equipamentos sofisticados presentes apenas em laboratórios especializados. Zhou et al. (2014) propõe uma opção mais barata e acessível aplicando o método de microfluidos para o diagnóstico de vários patógenos, onde foi possível a realização de uma Multiplex-LAMP detectando 10 espécies de bactérias distintas (*Nocardia seriolae*, *Pseudomonas putida*, *S.iniae*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *Vibrio fluvialis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus* e *Vibrio vulnificus*).

A bactéria *Renibacterium salmoninarum* é o agente causador da doença bacteriana renal (bacterial kidney disease - BKD) que afeta salmonídeos, podendo causar altas taxas de mortalidade em fazendas. O mecanismo de ação desse organismo ainda não é muito bem compreendido, e as metodologias moleculares podem auxiliar no diagnóstico precoce da doença (DELGHANDI, 2020). A eficiência da PCR em tempo real para detectar *R. salmoninarum* foi demonstrada a partir dos bons resultados encontrados (CHASE et al., 2006; HALAIHEL et al., 2009; PURCELL et al., 2011). Saleh et al. (2008) demonstraram a aplicação da LAMP, justificando a viabilidade da técnica no diagnóstico rápido e barato.

#### 4.9.3 Fungos

O uso de plantas e cereais como alimento na aquicultura é bem comum, porém essa ação pode transportar contaminantes como fungos para o sistema de cultivo aquícola (EMBABY et al., 2015). Viegas et al. (2019), realizaram diagnóstico molecular por qPCR como etapa para montar um mapeamento da carga fúngica presente no tratamento alimentar utilizado no cultivo de ouriço do mar (*Paracentrotus lividus*) e pepino do mar (*Holothuria tubulosa*).

A Saprolegniose é uma doença causada por organismos do gênero *Saprolegnia*. Esse patógeno normalmente afeta animais aquáticos tanto marinhos quanto de água doce, podendo causar lesões superficiais na pele e brânquias (ROY e YANONG, 2003). A condução de diagnósticos por PCR utilizando como sequências alvo os espaçadores internos transcritos (Internal transcribed spacer - ITS) dos genes de RNA ribossomais (rRNA) são ferramentas úteis para a identificação desses organismos. Jaies et al. (2019) utilizaram primers para detectar a presença das regiões ITS<sub>1</sub> e ITS<sub>2</sub> do gene ribossomal da espécie *Saprolegnia parasitica* em amostras de tecido de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). A utilização de ITS como marcadores para primers em qPCR e qLAMP podem ser utilizadas para quantificar os níveis de presença de *Saprolegnia sp.* em uma amostra de água de sistemas de aquicultura (GHOSH, 2019). Pela primeira vez, foi registrada a coleta de dados quantitativos moleculares na detecção de *Saprolegnia ferax* em carpa capim *Ctenopharyngodon idellus*, utilizando qPCR com primers direcionados para regiões do ITS e do gene 5.8S rRNA (WANG et al., 2014). O uso de ITS<sub>1</sub> e ITS<sub>2</sub> assim como o gene 5.8S rRNA também é aplicado para detectar presença de *Aphanomyces astaci* por PCR (OIDTMANN, 2004; REZINCIUC, 2014).

O microsporídeo *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) é o causador da doença microsporidiose hepatopancreática (Hepatopancreatic microsporidiosis - HPM). Recentemente têm sido reportado uma crescente presença deste organismo em cultivos de camarões peneídeos (*Penaeus monodon* e *Penaeus vannamei*) (SRITUNYALUCKSANA et al., 2014). Tang et al. (2015) desenvolveram um ensaio de PCR que possui como alvo a região do gene 18S rRNA de EHP, foi possível detectar a presença do parasita em amostras de tecido, fezes e água de cultivo. Foi desenvolvido uma qPCR utilizando SYBR Green I para detectar amostras contaminadas com EHP (LIU et al., 2016). Foi possível realizar diagnóstico de EHP em *P. vannamei* desenvolvendo um ensaio de qPCR possuindo como alvo subunidade ribossomal de DNA SSU (small subunit rDNA), utilizando TaqMan como sonda (LIU et al. 2018). A detecção de EHP foi através da técnica qLAMP é possível ser finalizada com eficácia em aproximadamente vinte minutos sem nenhum tipo de equipamento especial, apresentando grande potencial para análises locais próximo à cultivos (MA et al., 2019).

## **5 VANTAGENS E DESVANTAGENS**

Os custos para realização de diagnósticos moleculares mais convencionais como a PCR ainda são bem altos. A necessidade do uso de equipamentos sofisticados dificulta a acessibilidade da técnica, assim como o elevado preço dos reagentes necessários para a amplificação. Entretanto, conforme o tamanho do sistema de cultivo e o valor investido no negócio, pode ser justificável a aplicação dessas técnicas para o controle e mitigação de surtos de doenças com o propósito de diminuir os riscos de perdas por mortalidade. Mesmo que com preço elevado, a PCR apresenta eficiência muito mais elevada que os métodos convencionais de diagnóstico, os resultados ficam prontos muito mais rápido, além de garantir resultados muito mais confiáveis (ALTINOK e KURT; 2003). As técnicas de diagnóstico molecular estão caminhando para alcançarem um patamar mais simples e acessível, possibilitando o diagnóstico de patógenos em campo ser mais eficiente (BARON et al., 2014; MINARDI et al., 2019). O surgimento das técnicas isotermiais como LAMP e RPA mudaram a ideia de alto custo para os diagnósticos moleculares. A capacidade de serem conduzidas sem a oscilação de temperatura removeu a necessidade do uso de termocicladores para a prática. Em particular, a RPA apresenta uma simplicidade ainda maior na sua aplicação, que é a capacidade de ser realizada em temperatura ambiente (PIEPENBURG et al. 2006; DHAMA et al., 2014; PANG et al., 2019). Contudo, essas técnicas até então são muito novas, necessitando ainda da definição de metodologias para diagnóstico de uma diversidade de organismos.

## **6 PERSPECTIVAS FUTURAS**

O desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico molecular de patógenos na aquicultura está em constante avanço. O aprimoramento das ferramentas já existentes e o desenvolvimento de novas técnicas estão proporcionando análises bem mais simples, rápidas, baratas e eficientes. Porém, a aplicação dessas técnicas ainda é majoritariamente presente na área da pesquisa e pouco aplicadas em campo. Mesmo com o aumento da simplicidade das ferramentas, em geral, ainda são populares muitos diagnósticos moleculares mais convencionais que necessitam de entendimento técnico sobre o assunto.

É necessário ter conhecimento e experiência na área principalmente para realizar o desenvolvimento de primers, no preparo dos materiais e nas análises dos resultados, o que pode causar desinteresse na implementação dessas práticas nos setores aquícolas de menor porte. Porém, cada vez mais os métodos moleculares estão sendo capazes de serem realizados sem equipamentos sofisticados, com poucas etapas, mais rápidos e com resultados mais simples de observar. Já foi mostrado que é possível o desenvolvimento de kits prontos, técnicas isotérmicas e colorimétricas para facilitar o processo de diagnóstico, dessa forma, o fomento para desenvolvimento e pesquisa nesse âmbito pode ser um grande aliado para a popularização dessa prática na aquicultura.

## **7 CONCLUSÃO**

Atualmente, as ferramentas para diagnóstico molecular de patógenos na aquicultura apresentam ótima aplicabilidade no setor. As análises oferecem resultados muito mais rápidos, com especificidade e sensibilidade na detecção de organismos patogênicos. As bases de dados genéticos e softwares para desenvolvimento de ensaios que existem hoje são essenciais para realização das técnicas de amplificação. O nível tecnológico em que o mundo se encontra hoje é ideal para se trabalhar com metodologias moleculares devido a grande carga de dados e análises que são possíveis serem realizadas.

Nos últimos anos, o número de publicações aplicando novas técnicas de diagnóstico molecular na aquicultura e a diversificação de estudos de diferentes patógenos, vem aumentando bastante. Porém, o número de publicações resumindo e descrevendo essas técnicas e também a aplicação das mesmas em fazendas de cultivo, são bem baixos. Entretanto, o diagnóstico molecular de patógenos vem aos poucos ganhando seu espaço na aquicultura. O incentivo para adoção dessas técnicas no controle de doenças em cultivos e publicação dos resultados, principalmente econômicos, podem ajudar a estimular sua aplicação no setor.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; MORGAN, D; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. Garland Science. 6ª edição. 2017.
- ALTINOK, I; KURT, I. **Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review**. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. v.3, p.131-138. 2003.
- ARTIKA, I. M; WIYATNO, A; MA'ROEF, C. N. **Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization**. Infection, Genetics and Evolution. v.81:104215. 2020.
- AUSTIN, B; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. Springer: Dordrecht. ed. 6ª. 2016.
- BANDEIRA, J. T. **Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) em crustáceos e moluscos nativos no Rio Paraíba - PB**. Recife, 2016.
- BARON, J; FISHBOURNE, E; COUACY-HYMAN, E; ABUBAKAR, M; JONES, B. A; FROST, L; HERBERT, R; CHIBSSA, T. R; VAN'T KLOOSTER, G; AFZAL, M; AYEBAZIBWE, C; TOYE, P; BASHIRUDDIN, J; BARON, M. D. **Development and Testing of a Field Diagnostic Assay for Peste des Petits Ruminants Virus**. Transbound Emerg Dis, v.61, p.390-396. 2014.
- BIRKBECK, T. H; FEIST S. W; VERNER-JEFFREYS, D. W. **Francisella infections in fish and shellfish**. Journal of Fish Diseases, v.34, n.1, p.73-87, 2011.
- BARTKOVA, S; KOKOTOVIC, B; SKALL, H. F; LORENZEN, N; DALSGAARD, I. **Detection and quantification of Aeromonas salmonicida in fish tissue by real-time PCR**. J Fish Dis. v.40, p.231-241. 2017.
- BRACELAND, M; TINSLEY, J; COCKERILL, D; BICKERDIKE, R; MCLOUGHLIN, M. F; ECKERSALL, P. D. **Selective precipitation reaction: a novel diagnostic test for tissue pathology in Atlantic salmon, *Salmo salar*, infected with salmonid alphavirus (SAV3)**. J Fish Dis. v.40, n.8, p.1077-1087. 2017.
- BORRELL, N; ACINAS, S.G; FIGUERAS, M. J; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. **Identification of Aeromonas clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes**. J Clin Microbiol. v.35, p.1671-1674. 1997
- CANN, A. J. **Principles of Molecular Virology**. Sixth Edition. Department of Biology, University of Leicester, Leicester, UK: Elsevier. 2014.
- CAVALCANTI, M. P; LORENA, V. M. B; GOMES, Y. M. **Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias**. Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology. v.37, n.1, p.1-14, 2008.

CHANG, C. I; HUNG, P. H; WU, C. C; CHENG, T. C; TSAI, J. M; LIN, K. J; LIN, C. Y. **Simultaneous Detection of Multiple Fish Pathogens Using a Naked-Eye Readable DNA Microarray**. *Sensors*. v.12, p.2710-2728. 2012.

CHAPELA, M. J; FERREIRA, M; RUIZ-CRUZ, A, MARTIN-VARELA, I; FERNANDEZ-CASAL, J; GARRIDO-MAESTU, A. **Application of real-time PCR for early diagnosis of diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, and *Tenacibaculum maritimum* in turbot: a field study**. *J Appl Aquac*. v.30, p.76-89. 2018.

CHASE, D. M; ELLIOTT, D. G; PASCHO, R. J. **Detection and quantification of *Renibacterium salmoninarum* DNA in salmonid tissues by real-time quantitative polymerase chain reaction analysis**. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.18, p.375-380. 2006.

CHESTER, N; MARSHAK, D. R. **Dimethyl sulfoxide-mediated primer Tm reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction**. *Anal Biochem*. v.209, n.2, p.284-290. 1993.

CRAW, P; BALACHANDRAN, W. **Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review**. *Lab Chip* v.12, p.2469-2486, 2012.

DAHER, R. K; STEWART, G; BOISSINOT, M; BOUDREAU, D. K; BERGERON, M. G. **Influence of sequence mismatches on the specificity of Recombinase Polymerase Amplification technology**. *Molecular and Cellular Probes*. v.29, n.2, p.116-121, 2015.

DELGHANDI, M. R; EL-MATBOULI, M; MENANTEAU-LEDOUBLE, S. ***Renibacterium salmoninarum*: the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fish**. *Pathogens*. v.9, p.845. 2020.

DHAMA, K; KARTILIK, K; CHAKRABORTY, S; TIWARI, R; KAPOOR, S; KUMAR, A.; THOMAS, P. **Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA (LAMP): A New Tool Lights the World of Diagnosis of Animal and Human Pathogens: A Review**. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. v.17, ed.2, p.151-166, 2014.

DONG, H. T; TAENGPHU, S; SANGSURIYA, P; CHAROENSAPSRI, W; PHIWSAIYA, K; SORNWATANA, T; KHUNRAE, P; RATTANAROJPONG, T; SENAPIN, S. **Recovery of *Vibrio harveyi* from scale drop and muscle necrosis disease in farmed barramundi, *Lates calcarifer* in Vietnam**. *Aquaculture*. v.473, p.89-96, 2017.

DU Y. S; LIU, Y; XIAO, P; MENG, L. J; LIU, P. F. **Development and application of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Aeromonas salmonicida***. *Journal of the World Aquaculture Society*. v.48, p.574-582. 2017.



EMBABY, E. M; AYAAT, N. M; EL-GALIL, M. M. A; ABDEL-HAMEID, N. A; GOUDA, M. M. **Mycoflora and mycotoxin contaminated chicken and fish feeds.** Middle East J Appl Sci. v.5, p.1044-1054. 2015.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA): Meeting the Sustainable Development Goals, Food and Agriculture Organization, Rome, Italy, 2020. 224 p.

FERNANDEZ-ALVAREZ, C; GONZALEZ, S.F; SANTOS, Y. **Development of a SYBR green I real-time PCR assay for specific identification of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.** Applied Microbiology and Biotechnology. v.100, p.10585-10595. 2016.

FIGUERAS, M. J; SOLER, L; CHACÓN, M. R; GUARRO, J; MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. **Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis.** Int J Syst Evol Microbiol. v.50, p.2069-2073. 2000.

FRANS, I; MICHELS, C. W; BOSSIER, P; WILLEMS, K. A; LIEVENS, B; REDIERS, H. ***Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention.** Journal of Fish Diseases. v.34, n.6, p.43-61, 2011.

FUHRMAN, J. A. **Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects.** Nature. v.399, p.541-548. 1999.

GERARD, G. F; FOX, D. K; NATHAN, M; D'ALESSIO, J. **Reverse Transcriptase: The use of cloned moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA.** Molecular Biotechnology, v.8, p.61-77. 1997.

GHATAK, S; AGARWAL, R. K; BHILEGAONKAR, K. N. **Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA.** Lett Appl Microbiol. v.44, p.550-554. 2007.

GHOSH, S. **Molecular Detection and Quantification of the Fish Pathogen *Saprolegnia* spp. Using qPCR and Loop Mediated Isothermal Amplification.** Dissertação (Pós Doutorado em Ciências Biológicas) - Bowling Green State University. Ohio. p. 125. 2019.

GOMEZ-GIL, B; SOTO-RODRIGUEZ, S; GARCIA-GASCA, A; ROQUE, A; VAZQUEZ-JUAREZ, R; THOMPSON, F. L; SWINGS, J. **Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms.** Microbiology. v.150, p.1769-1777. 2004.

GOVINDARAJU, K; DILIP ITROUTWAR, P; VEERAMANI, V; KUMAR, T. A; TAMILSELVAN, S. **Application of Nanotechnology in Diagnosis and Disease Management of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Aquaculture.** J Clust Sci, v.31, p.1163-1171, 2020.

GRAF J. **Diverse restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species.** J Clin Microbiol. v37, p.3194-3197.1999.

GRAF, J. **Aeromonas**. United Kingdom: Caister Academic Press. 2015.

HALAIHEL, N; VENDRELL, D; RUIZ-ZARZUELA, I; DE BLAS, I; ALONSO, J. L; GIRONÉS, O; MUZQUIZ, J. L. **A new real time PCR-based assay for diagnosing *Renibacterium salmoninarum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and comparison with other techniques**. Journal of Microbiological Methods. v. 76, p. 75-80. 2009.

HUI, A., WONG, A., & HOJILLA, C. **Clinical applications of the polymerase chain reaction for molecular pathology**. IN J. Bartlett, A. Shaaban, F. Schmitt (Eds.), Molecular Pathology: A Practical Guide for the Surgical Pathologist and Cytopathologist. Cambridge: Cambridge University Press. p. 55-70. 2015.

JACQUET, S; MIKI, T; NOBLE, R; PEDUZZI, P; WILHELM, S. **Viruses in aquatic ecosystems**: important advancements of the last 20 years and prospects for the future in the field of microbial oceanography and limnology. Advances in Oceanography and Limnology. v.1, n.1, p.97-141, 2010.

JAIES, I; SHAH, F, A; ABUBAKR, A; ASMI, O; BHAT, B. A; BALKHI, M. H. **PCR Based Identification of *Saprolegnia parasitica* Affecting Rainbow Trout Aquaculture in Kashmir Region of Indian Himalayas**. Indian Journal of Animal Research. 2020.

JAMES, A; MACDONALD, J. **Recombinase polymerase amplification**: emergence as a critical molecular technology for rapid, low resource diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. v.15, p.1475–1489. 2015.

KEELING, S. E; BROSNAHAN, C. L; JOHNSTON, C; WALLIS, R; GUDKOV, N; MCDONALD, W. L. **Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of *Aeromonas salmonicida***. J Fish Dis. v.36, p.495-503. 2013.

KHUNTHONG, S; JAROENRAMB, W; ARUNRUTB, N; SUEBSING, R; MUNGSANTISUKA, I; KIATPATHOMCHAIB, W. **Rapid and sensitive detection of shrimp yellow head virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick**. Journal of Virological Methods, v.188, p.51-56. 2013.

KIM, M. S; CHO, J. Y; CHOI, H. S. **Identification of *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyenteri*, and *Photobacterium damselae* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea by multiplex PCR developed using the *rpoB* gene**. Fish Sci, v.80, p.333-339. 2014.

KUBITZA, F; KUBITZA, L. M. M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 4ª edição. Jundiaí: F. Kubitza, 116 p. 2004.

LEE, C; CHO, J. C; LEE, S. H; LEE, D. G; KIM, S. J. **Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm**. J Appl Microbiol. v.93, p.976-985. 2002.

- LEE, D. E.; LEE, J; KIM, Y. M; MYEONG J. I; KIM, K. H. **Uncultured bacterial diversity in a seawater recirculating aquaculture system revealed by 16S rRNA gene amplicon sequencing.** Journal of Microbiology. v.54, p.296-304. 2016.
- LEUNG, T. L. F; BATES, A. E. **More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: Implications for food security.** Journal of Applied Ecology. v.50, n.1, p.215-222, 2013.
- LI, Y; ENDO, H; GOTOH, Y; WATAI, H; OGAWA, N; BLANC-MATHIEU, R; YOSHIDA, T; OGATA, H. **The earth is small for “Leviathans”:** long distance dispersal of giant viruses across aquatic environments. Microbes and Environments. v.34, n.3, p.334-339. 2019.
- LIMA, L. M. **Conceitos básicos de técnicas em biologia molecular.** 1ª Edição. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão. p. 27, 2008.
- LIU, Z; ZHANG, Q. L; WAN, X. Y; MA, F; HUANG, J. **Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with different growth rates.** Mar. Fish. Res., v. 37, p.119-126. 2016.
- LIU, Y. M; QIU, L; SHENG, A. Z; WAN, X. Y, CHENG, D. Y; HUANG, J. **Quantitative detection method of *Enterocytozoon hepatopenaei* using TaqMan probe real-time PCR.** Journal of Invertebrate Pathology. v.151, p.191-196, 2018.
- MA, B; YU, H; FANG, J; SUN, C; ZHANG, M. **Employing DNA binding dye to improve detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in real-time LAMP.** Scientific Reports. 9:15860, 2019.
- MCCLEARY, S; HENSHILWOOD, K. **Novel quantitative TaqMan® MGB real-time PCR for sensitive detection of *Vibrio aestuarianus* in *Crassostrea gigas*.** Dis Aquat Organ. v.114, n.3, p.239-248. 2015.
- MCKEEVER, D.J; REGE, J.E.O. **Vaccines and diagnostic tools for animal health: the influence of biotechnology.** Livest. Prod. Sci. v.59, p. 257-264, 1999.
- MCPHERSON, M. J; QUIRKE, P; TAYLOR, G. R. **PCR: A Practical Approach.** Oxford: Oxford University Press. p. 253, 1991.
- MINARDI, D; BATEMAN, K. S; KUZDZAL, A; STONE, M; AVANT. J; CONDLIFFE, R; BROTHERTON, P; LAVERICK, M; SRITUNYALUCKSANA, K; ITSATHITPHAISARN, O; BAOPRASERTKUL, P; STENTIFORD, G. D. **Testing of a pond-side molecular diagnostic tool for the detection of white spot syndrome virus in shrimp aquaculture.** World Aquaculture Soc. v.50, p.18-33, 2019.
- NASCIMENTO, S; SUAREZ, E. R; PINHAL, M. A. S. **Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica.** Revista Brasileira de Medicina. v.67, p. 7-19. 2010.

NONOHAY, J. S; HEPP, D. **Técnicas e análises de biologia molecular**. In: Bruno, A. N. Biotecnologia II: princípios e métodos. Porto Alegre: Artmed. p.232, 2014.

NOTOMI, T; OKAYAMA, H; MASUBUCHI, H; YONEKAWA, T; WATANABE, K; AMINO, N; HASE, T. **Loop-mediated isothermal amplification of DNA**. Nucleic Acids Res. v.28, n.12. 2000.

OIDTMANN, B; SCHAEFERS, N; CERENIUS, L; SÖDERHÄLL, K; HOFFMANN, R. W. **Detection of genomic DNA of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR**. Veterinary Microbiology. v.100, n.3, p.269-282. 2004.

OIE. **Aquatic Animal Health Code**. World Organisation for Animal Health. ed. 22, 2019.

PANG, J. H; WANG, Q; FEI Y. J; ZHUA, P; QIAO, L. L; HUANG, H. L; DANG, C. Y; GAO, W. F. **A real-time recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of *Vibrio harveyi***. Mol Cell Probes v.44, p.8-13, 2019.

PAVAN, M. G; MONTEIRO, F. A. **Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial**. In: Galvão, C. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, p.241-260, 2014.

PAVANELLI, G. C; EIRAS J. C; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3ª edição. Maringá: UEM. 311 p. 2008

PIERCE, L. R; WILLEY J. C; PALSULE V. V; YEO, J; SHEPHERD B. S; CRAWFORD, E. L; STEPIEN, C. A. **Accurate Detection and Quantification of the Fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV) with a Two-Color Fluorometric Real-Time PCR Assay**. PLOS ONE.8(8): e71851. 2013.

PIEPENBURG, O; WILLIAMS C. H; STEMPLE D. L; ARMES, N. A. **DNA detection using recombination proteins**. PLoS Biol. v.4:e204. 2006.

PINHEIRO, A.C.A.S; VOLPE, E; PRINCIPI, D; PROSPERI, S; CIULLI, S. **Development of a multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of the major viruses that affect rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. *Aquacult Int.* v.24, p.155-125, 2016.

PRIDGEON, J. W; KLESIUS, P. H. **Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development**. Animal Science Reviews, v. 7, 2012.

PUAH, S. M; KHOR, W. C; KEE, B. P; TAN, J. A. M. A; PUTHUCHEARY, S. D; CHUA, K. H. **Development of a species-specific PCR-RFLP targeting rpoD gene fragment for discrimination of *Aeromonas* species**. J Med Microbiol. v.67, p.1271-1278. 2018.

PURCELL, M. K; GETCHELL, R. G; MCCLURE, C. A; GARVER, K. A. **Quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of aquatic animal pathogens in a**

**diagnostic laboratory setting.** Journal of Aquatic Animal Health. v.23, p.148-161. 2011.

PURCELL, M. K; POWERS, R. L; EVERED, J; KERWIN, J; MEYERS, T. R; STEWART, B; WINTON, J. R. **Molecular testing of adult Pacific salmon and trout (*Oncorhynchus* spp.) for several RNA viruses demonstrates widespread distribution of piscine orthoreovirus in Alaska and Washington.** *J Fish Dis.*, v.41, p.347-355. 2018.

RAJA, R. A; KUMAR, T, S; ALAVANDI, S. V; VIJAYAN, K. K. **OIE listed shrimp diseases of shrimp: An Overview.** ICAR - Central Institute of Brackishwater Aquaculture, Santhome High Road, Raja Annamalai Puram, Chennai - 600028, Índia, 2016.

RAJENDRAN, V; PANDEY, A; RAJAN, J. S; RAJ, J. M. **Collection, preservation and processing of shrimp samples for detection of pathogens by PCR.** ICAR - Central Institute of Brackishwater Aquaculture, #75 Santhome High Road, Raja Annamalai Puram, Chennai - 600028, Índia, 2016.

RAMSDEN, J. **Bioinformatics: An Introduction.** 2ª Edição. New York: Springer. p.308. 2009.

REZINCIUC, S; GALINDO, J; MONTSERRAT, J; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. **AFLP-PCR and RAPD-PCR evidences of the transmission of the pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) to wild populations of European crayfish from the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*.** *Fungal Biology.* v.118, n.7, p.612-620, 2014.

ROY, P. E; YANONG, V. M. D. **Fungal diseases of fish.** The Veterinary Clinics exotic animals. v.6, p.377-400. 2003.

RYE, C.; WISE, R; JURUKOVSKI, V; DESAIX, J; CHOI, J; AVISSAR, Y. **Biology.** Houston, Texas: OpenStax. 2016.

SALEH, M; SOLIMAN, H; EL-MATBOULI, M. **Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease.** *Disease of Aquatic Organisms.* v. 81, p. 143-151. 2008.

SCHIKORSKI, D; RENAULT, T; PAILLARD C; BIDAULT-TOFFIN, A; TOURBIEZ, D; SAULNIER, D. **Development of TaqMan real-time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture.** *Aquaculture.* v.392-395, p.106-112, 2013.

SCHORDERET, D. F. **Polymerase chain reaction: basic principles.** Schweiz Rundsch Med Prax. v.83, n.20, p.588-594. 1994.

SHAKIBAIE, M. R. **Principles of molecular bacteriology**. Department of Microbiology and Immunology, Krman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. p.122. 2009.

SHARMA, R; RANJAN, R; KAPARDAR, RAJ; GROVER, A. **Unculturable' bacterial diversity**: An untapped resource. *Current science*. v. 89, p.72, 2005.

SHI, W; SONG, A; GAO, S; WANG, Y; TANG, L; XU, Y; REN, T; LI, Y; LIU, M. **Rapid and sensitive detection of salmonid alphavirus using TaqMan real-time PCR**. *Molecular and Cellular Probes*. v.34, p.13-20, 2017.

SIQUEIRA, T. V. **Aquicultura**: A nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável. *Boletim regional, urbano e ambiental*. v.17. 2017.

SNOW, M; BLACK, J; MATEJUSOVA, I; MCINTOSH, R; BARETTO, E; WALLACE, I.S; BRUNO. D.W. **Detection of salmonid alphavirus RNA in wild marine fish: implications for the origins of salmon pancreas disease in aquaculture**. *Dis Aquat Org* v.91, p.177-188, 2010.

SNOW, M. **The contribution of molecular epidemiology to the understanding and control of viral diseases of salmonid aquaculture**. *Veterinary Research*. p.42-56. 2011.

SOUZA, M. T. **Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose**. IN: Azevedo, M. O; Felipe, M. S. S; Brígido, M. M; Maranhão, A. Q.; Souza, M. T. de. *Técnicas básicas em biologia molecular*. Brasília, DF: Universidade de Brasília, p. 211, 2003.

SRITUNYALUCKSANA, K; SANGUANRUT, P; SALACHAN, P. V; THITAMADEE, S; FLEGEL, T. W. **Urgent appeal to control spread of the shrimp microsporidian parasite *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)**. *Aquaculture Asia*. n. 1, p.31-32, 2014.

STENTIFORD G. D; SRITUNYALUCKSANA, K; FLEGEL T. W; WILLIAMS B. A. P; WITHYACHUMNARNKUL B, ITSATHITPHAISARN, O; BASS, D. **New Paradigms to Help Solve the Global Aquaculture Disease Crisis**. *PLOS Pathogens*. v.13, n.2, e1006160. 2017.

SUEBSING, R; PROMBUN, R; KIATPATHOMCHAI, W. **Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) combined with colorimetric gold nanoparticle (AuNP) probe assay for visual detection of *Penaeus vannamei* nodavirus (PvNV)**. *Letters in Applied Microbiology*. v.56, p.428-435. 2013.

TANG, K. F. J; PANTOJA, C. R; REDMAN, R. M; HAN, J. E; TRAN, L. H; LIGHTNER, D. V. **Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp**. *Journal of Invertebrate Pathology*. v.130, p.37-41. 2015.

TAVECHIO, W. L. G; GUIDELLI, G; PORTZ, L. **Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura.** B. Inst. Pesca, São Paulo, v.35, n.2, p.335-341, 2009.

TEIGE, L. H; AKSNES, I; RØSÆG, M. V; JENSEN, I; JØRGENSEN, J; SINDRE, H; COLLINS, C; COLLET, B; RIMSTAD, E; DAHLE, M. K; BOYSEN, P. **Detection of specific Atlantic salmon antibodies against salmonid alphavirus using a bead-based immunoassay.** Fish & Shellfish Immunology. v.106, p.374-383, 2020.

THOMPSON, C. C; VICENTE, A. C; SOUZA, R. C; VASCONCELOS, A. T; VESTH, T; ALVES JR. N; USSERY, D. W; IIDA, T; THOMPSON, F. L. **Genomic taxonomy of vibrios.** BMC Evolutionary Biology. v.9, p.258. 2009.

TRAVERS, M. A. **Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata*: approches physiologiques, cellulaires et moléculaires.** Tese (Pós Doutorado). Université de Bretagne Occidentale, Brest, França. 2008.

TSAI, Y.L; WANG, H.T.T; CHANG, H.F.G; TSAI, C.F; LIN, C.K; ET AL.. **Development of TaqMan probe-based insulated isothermal PCR (iiPCR) for sensitive and specific on-site pathogen detection.** PLoS ONE, v.7, n.9, 2012.

UNTERGASSER, A; CUTCUTACHE, I; KORESSAAR, T; YE, J; FAIRCLOTH, B. C; REMM, M; ROZEN, S. G. **Primer3-new capabilities and interfaces.** Nucleic Acids Research. v.40, n.15, e115. 2012.

VAN PELT-VERKUIL, E; BELKUM, A; HAYS, J. P. **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification.** Dordrecht: Springer. 2008.

VIEGAS, C; ESTEVES, L; FARIA, T; POMBO, A; CAETANO, L. A; GOMES, A. Q; TWARUZEK, M; KOSICKI, R; GRAJEWSKI, J; VIEGAS, S. **Fungal diversity and mycotoxin distribution in echinoderm aquaculture.** *Mycotoxin Research.* v.35, p.253-260. 2019.

WAGENER, C. **Molecular diagnostics.** Journal of Molecular Medicine. v.75, p.728-744, 1997.

WELI, S. C; BERNHARDT, L; QVILLER, L; MYRMEL, M; LILLEHAUG, A. **Development and evaluation of a method for concentration and detection of salmonid alphavirus from seawater.** Journal of Virological Methods. v.287, 113990. 2021.

WIJSMAN, J. W. M., TROOST, K., FANG, J., AND RONCARATI, A. **“Global production of marine bivalves. trends and challenges,”** In: Smaal, A. C; Ferreira, J. G; Grant, J; Petersen, J. K; Ø Strand. Goods and Services of Marine Bivalves, eds . Berlin: Springer. p. 7-26. 2019.

WANG, H; ZHANG, N; YU, F; LU, L. **The relationship between the concentration of *Saprolegnia* spores and outbreak of Saprolegniasis.** Resumos de artigos da Conferência Anual da Sociedade Chinesa de Pesca. 2014.

WORLD BANK. **Reducing disease risks in aquaculture**. World Bank Report #88257-GLB. 2014.

YANG, X; ZHANG, X; WANG, Y; SHEN, H; JIANG, G; DONG, J; ZHAO, P; GAO, S. **A Real-Time Recombinase Polymerase Amplification Method for Rapid Detection of *Vibrio vulnificus* in Seafood**. *Frontiers in Microbiology*. v.11, p.27-51. 2020.

YOO, S. M; LEE, S. Y. **Diagnosis of pathogens using DNA microarray**. *Recent Patent Biotechnology*. v.2, p. 124-129. 2008.

YU, L. P; HU, Y. H; ZHANG, X. H; SUN, B. G. **Development of a triplex loop-mediated isothermal amplification method for rapid on-site detection of three *Vibrio* species associated with fish diseases**. *Aquaculture*. v.414, p.267-273, 2013.

ZAHA, A; FERREIRA, H. B; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**, 4<sup>a</sup> edição. ArtMed, 2012.

ZHOU, Q. J; WANG, L; CHEN, J; WANG, R. N; SHI, Y. H; LI, C. H; ZHANG, D. M; YAN, X. J; ZHANG, Y. J. **Development and evaluation of a real-time fluorogenic loop-mediated isothermal amplification assay integrated on a microfluidic disc chip (on-chip LAMP) for rapid and simultaneous detection of ten pathogenic bacteria in aquatic animals**. *Journal of Microbiological Methods*, v.104, p.26-35. 2014.

ZHU, P; HUANG, H; GAO, W. **Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish by Real-Time Recombinase Polymerase Amplification**. *Food Analytical Methods*. v.11, p.2076-2084. 2018.

ZOU, Y; MASON, M. G; BOLLETA, J. R. **Evaluation and improvement of isothermal amplification methods for point-of-need plant disease diagnostics**. *PLoS ONE*. v.15, n.6. 2020.