



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E  
BIODIVERSIDADE**

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DA REAÇÃO DE  
AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP) PARA  
DIAGNÓSTICO DE *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis  
niloticus*).**

**VALERIA BELEN ESPINOLA MACIEL**

Foz do Iguaçu  
2023

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DA REAÇÃO DE  
AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP) PARA  
DIAGNÓSTICO DE *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis  
niloticus*).**

**VALERIA BELEN ESPINOLA MACIEL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana.

Foz do Iguaçu  
2023



## ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao dia 02 do mês de Junho do ano de 2023, realizou-se a apresentação pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado “**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP) PARA DIAGNÓSTICO DE *Streptococcus agalactiae* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**”, apresentado pela discente Valeria Belen Espinola Maciel, do curso de Ciências Biológicas. Os trabalhos foram iniciados às 15:00, pelo docente orientador Kelvinson Fernandes Viana, presidente da banca examinadora, juntamente com os docentes Cristian Rojas e o docente Simone Lima São Pedro

### Observações da Banca Examinadora:

--

A Banca Examinadora, ao término da apresentação oral e da arguição do acadêmico, encerrou os trabalhos às 16:00 h. Os examinadores atribuíram as seguintes notas:

orientador(a)	nota final: 10.0	Média final: <b>10.0</b>
docente	nota final: 10.0	
docente	nota final: 10.0	

Proclamado o resultado pelo presidente da banca examinadora, encerraram-se os trabalhos e, para constar eu Kelvinson Fernandes Viana lavrei a presente Ata que assino juntamente com os demais membros da banca.

Foz do Iguaçu, 02 de junho de 2023.

Assinaturas:

Simone Lima São Pedro	UNILA	
Cristian Rojas	UNILA	
Kelvinson Viana	UNILA	

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Valeria Belen Espinola Maciel

Curso: Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade

Tipo de Documento

- |   |  |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> graduação | <input type="checkbox"/> artigo                                    |
| <input type="checkbox"/> especialização       | <input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso |
| <input type="checkbox"/> mestrado             | <input type="checkbox"/> monografia                                |
| <input type="checkbox"/> doutorado            | <input type="checkbox"/> dissertação                               |
|   | <input type="checkbox"/> tese                                      |
|   | <input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais               |
|   | <input type="checkbox"/> _____                                     |

Título do trabalho acadêmico: Desenvolvimento e padronização da técnica da reação de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) para diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*).

Nome do orientador(a): Dr. Kelvinson Fernandes Viana.

Data da Defesa: 02/06/2023

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 02 de junho de 2023.

---

Assinatura do Responsável

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha profunda gratidão a Deus por tudo. Agradeço à minha mãe, pois sua presença e apoio nos momentos difíceis foram fundamentais para que eu superasse os desafios ao longo desse caminho. Minha mãe é uma mulher incansável, sempre preocupada com seus filhos e presente em todos os dias de nossas vidas. Sou imensamente grata por sua constante motivação para nos tornarmos pessoas melhores. Também desejo agradecer aos meus irmãos por seu apoio à distância e por estarem sempre disponíveis quando eu precisava.

Aos meus padrinhos, Ada e Antonio, devo um agradecimento especial. Sem eles, não teria a oportunidade de estudar em uma Universidade Federal fora do meu país de origem. Agradeço por sempre acreditarem em mim e ser parte da minha educação e formação. São verdadeiros segundos pais para mim, e tenho muito orgulho de tê-los em minha vida. Serei eternamente grata pelo apoio que me oferecem diariamente.

Ao meu professor orientador, Dr. Kelvinson Fernandes Viana, gostaria de expressar minha gratidão pela oportunidade de participar deste projeto, que me proporcionou um imenso crescimento pessoal e conhecimento. Agradeço pela orientação brindada ao longo deste trabalho.

Aos professores da banca, Dr. Cristian Antonio Rojas e Dra. Simone Lima São Pedro, gostaria de agradecer por aceitarem o convite para participar como avaliadores. São pessoas que admiro profundamente e sua presença na banca avaliadora contribui significativamente para aprimorar meu trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, Angelo e Adrieli, que estiveram ao meu lado durante toda a execução do projeto. Eles me ensinaram desde os conceitos mais básicos do laboratório até os mais complexos. A contribuição de vocês foi fundamental para aprimorar as técnicas utilizadas e fazer com que o projeto avançasse. Agradeço pelas inúmeras horas de paciência no laboratório, pela parceria e por me acolherem, deixando de lado seus próprios afazeres para me ensinar tudo desde o início.

Não posso deixar de mencionar meus colegas de curso, que são pessoas maravilhosas e se tornaram parte essencial dessa longa jornada. Também gostaria de

agradecer à UNILA por me proporcionar a oportunidade de ter uma vaga sendo estrangeira e dar a todos os alunos um ensino de qualidade.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à Fundação do Parque Tecnológico da Itaipu por ter sido uma parceira fundamental ao longo de todos esses anos de estudo, proporcionando apoio econômico e acompanhando de perto minha formação. Agradeço sinceramente pelo suporte recebido por meio do convênio de apoio financeiro para estudantes de graduação paraguaios da UNILA-AEP COHORTE 2018, que foi essencial para o meu crescimento acadêmico e profissional.

A todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos nesse trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é amplamente cultivada em todo o mundo, sendo um dos peixes de maior produção e grande importância econômica para muitos países, incluindo o Brasil. Portanto, perdas na produção causam impactos significativos na indústria aquícola, principalmente, em caso de surtos epizooticos. Infelizmente, as tilápias são vulneráveis a várias infecções bacterianas, como a estreptococose causada pelo patógeno *Streptococcus agalactiae*. Um desafio enfrentado é a falta de um método de diagnóstico rápido para fornecer tratamentos adequados aos peixes. Consequentemente, é crucial desenvolver um método rápido, específico e acessível para detectar esse patógeno. Atualmente, a técnica de Amplificação Isotérmica Mediada por loop (LAMP) tem sido amplamente utilizada em diversos campos da biologia, demonstrando ser rápida, simples, sensível e específica na detecção de vários patógenos, amplificando o DNA alvo a uma temperatura constante e produzindo múltiplas cópias. O objetivo deste estudo é desenvolver o ensaio LAMP como um método simples e rápido para detectar a bactéria *Streptococcus agalactiae*, que infecta as tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), assim como também, padronizar a técnica LAMP qualitativa para a identificação de *S. agalactiae* e testar a especificidade dos *primers* utilizando outras cepas bacterianas, comumente presentes em tilápias e no ambiente em que vivem. Para isso, as cepas bacterianas foram cultivadas a partir de amostras criopreservadas, o DNA foi extraído e foram realizados testes de padronização em três temperaturas diferentes (55 °C, 60 °C e 65 °C), utilizando três pares de *primers* para aumentar a amplificação. Já para o teste de especificidade dos *primers*, as cinco cepas bacterianas foram submetidas às mesmas condições de reação utilizadas na padronização, mas com uma temperatura de 60 °C, e a detecção visual foi feita utilizando o corante SYBR Green I. Os resultados demonstraram que foi possível padronizar a reação de forma simples, com amplificação do produto a 60 °C. Essa temperatura foi utilizada no teste de especificidade dos *primers*, no qual a técnica LAMP mostrou amplificação específica para *S. agalactiae* em comparação com as outras bactérias, sem ocorrência de amplificação cruzada. Dessa forma, a técnica LAMP se mostrou rápida e simples, sendo ideal para a detecção de patógenos como *S. agalactiae*. Recomenda-se a realização de estudos futuros utilizando amostras de tecido fresco de tilápias do Nilo, a fim de avaliar a sensibilidade do teste e explorar outros parâmetros relevantes.

**Palavras-chave:** LAMP; diagnóstico; tilápias; *Streptococcus agalactiae*; patógenos.

## RESUMEN

La tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) se cultiva ampliamente en todo el mundo, siendo uno de los peces de mayor producción y de gran importancia económica para muchos países, incluido Brasil. Por lo tanto, las pérdidas de producción provocan impactos significativos en la industria acuícola, principalmente, en caso de brotes epizooticos. Desafortunadamente, la tilapia es vulnerable a varias infecciones bacterianas, como la estreptococosis causada por el patógeno *Streptococcus agalactiae*. Un desafío que se enfrenta es la falta de un método de diagnóstico rápido para brindar tratamientos adecuados a los peces. En consecuencia, es crucial desarrollar un método rápido, específico y accesible para detectar este patógeno. Actualmente, la técnica de Amplificación Isotérmica mediada por Loop (LAMP) ha sido ampliamente utilizada en varios campos de la biología, demostrando ser rápida, simple, sensible y específica en la detección de varios patógenos, amplificando el ADN a una temperatura constante y produciendo múltiples copias. El objetivo de este estudio es desarrollar el ensayo LAMP como un método simple y rápido para detectar la bacteria *Streptococcus agalactiae*, que infecta a la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), así como estandarizar la técnica LAMP cualitativa para la identificación de *S. agalactiae* y evaluar la especificidad de los *primers* utilizando otras cepas bacterianas, comúnmente presentes en la tilapia y en el entorno en el que viven. Para ello, se cultivaron cepas bacterianas a partir de muestras criopreservadas, se extrajo el ADN y se realizaron pruebas de estandarización a tres temperaturas diferentes (55 °C, 60 °C y 65 °C), utilizando tres pares de *primers* para aumentar la amplificación. En cuanto a la evaluación de especificidad de los *primers*, las cinco cepas bacterianas se sometieron a las mismas condiciones de reacción utilizadas en la estandarización, pero con una temperatura de 60 °C, y la detección visual se realizó con el colorante SYBR Green I. Los resultados demostraron que era posible estandarizar la reacción de forma sencilla, con amplificación del producto a 60 °C. Esta temperatura se utilizó en la evaluación de especificidad de los *primers*, en la que la técnica LAMP mostró una amplificación específica para *S. agalactiae* en comparación con otras bacterias, sin que se produjera una amplificación cruzada. Así, la técnica LAMP demostró ser rápida y sencilla, siendo ideal para la detección de patógenos como *S. agalactiae*. Se recomienda realizar futuros estudios utilizando muestras de tejido fresco de tilapia del Nilo, con el fin de evaluar la sensibilidad de la prueba y explorar otros parámetros relevantes.

**Palabras clave:** LAMP; diagnóstico; tilapias; *Streptococcus agalactiae*; patógenos.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Produção mundial de tilápia desde seu registro em 1950 até 2014 .....	14
<b>Figura 2</b> - Porcentagem de produção de peixes cultivados no Brasil .....	15
<b>Figura 3</b> - Esquema dos <i>primers</i> FIP, BIP, F3 e B3 .....	20
<b>Figura 4</b> - Esquema da etapa não-cíclica da LAMP .....	21
<b>Figura 5</b> - Bactérias criopreservadas sendo preparadas para reativação. ....	26
<b>Figura 6</b> - Reativação e cultivo das bactérias. ....	27
<b>Figura 7</b> - Cultivos bacterianos em meio Extrato de Levedura.....	27
<b>Figura 8</b> - Amostras testadas nas temperaturas de 65 °C e 60 °C.....	29
<b>Figura 9</b> - <i>Primers</i> FIP, BIP, F3, B3, LB e LF.....	30
<b>Figura 10</b> - Teste da especificidade dos <i>primers</i> .....	31
<b>Figura 11</b> - Visualização a olho nu da mudança de coloração das amostras.....	33
<b>Figura 12</b> - Visualização a olho nu da mudança de coloração nas amostras .....	34
<b>Figura 13</b> - Detecção visual das amostras .....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - <i>Primers</i> a ser utilizados para detecção de <i>S. agalactiae</i> . ....	28
<b>Tabela 2</b> - Temperaturas e amostras testadas para a padronização da LAMP. ....	29
<b>Tabela 3</b> - Concentrações para reação de LAMP. <i>S. agalactiae</i> . ....	30
<b>Tabela 4</b> - Resultado da extração e dosagem do DNA das amostras. ....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>a.C</b>	Antes de Cristo
<b>B3</b>	<i>Backward Outer Primer</i>
<b>BIP</b>	<i>Backward Internal Primer</i>
<b>Bst</b>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxicitidina trifosfato
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>F3</b>	<i>Foward Outer primer</i>
<b>FIP</b>	<i>Foward Internal Primer</i>
<b>FTA</b>	<i>Flinders Technology Associates</i>
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HNB</b>	Azul de hidroxinaftol
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>LAMP</b>	<i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
<b>LB</b>	<i>Backward loop primer</i>
<b>LF</b>	<i>Forward loop primer</i>
<b>M</b>	Mol/L
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnésio
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de amônio
<b>ng</b>	Nanograma
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>RNAr</b>	Ácido ribonucleico ribossômico

<b>RT-LAMP</b>	<i>Reverse transcriptase-loop mediated isothermal amplification</i>
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>Tm</b>	Temperatura de Melting
<b>U</b>	Unidade
<b>μL</b>	MicroLitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>°C</b>	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
2.1 TILAPICULTURA NO BRASIL .....	14
2.2 TILÁPIA DO NILO ( <i>Oreochromis Niloticus</i> ) .....	15
2.3 BACTÉRIAS PRESENTES EM TILÁPIAS .....	16
2.4 ESTREPTOCOCOSE .....	17
2.5 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	18
2.6 DIAGNÓSTICO CLÍNICO MOLECULAR .....	19
2.6.1 PCR .....	19
2.6.2 LAMP .....	20
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
GERAL .....	25
ESPECÍFICOS .....	25
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
4.1 CEPAS BACTERIANAS .....	26
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	26
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA .....	27
4.5 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO LAMP .....	28
4.6 ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS .....	30
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
5.1 EXTRAÇÃO DE DNA .....	32
5.2 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO LAMP .....	32
5.3 ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS .....	33
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A importância econômica da piscicultura no Brasil é bastante relevante, sendo um dos segmentos de produção animal que mais cresce no país e no mundo (CONTE, 2004). Dentro do contexto do mercado brasileiro a tilápia (*Oreochromis spp.*) é a espécie de peixe mais produzida, sendo que dados estatísticos sobre a piscicultura nacional mostram que a tilápia representou aproximadamente 63,5% da produção do país em 2021, acumulando 45% de aumento desde 2014 (PEIXE BR, 2022).

A Tilápia ou tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) é uma espécie introduzida, pois as tilápias são originárias da Bacia do Rio Nilo provenientes da África (BOSCOLO *et al.*, 2001). A temperatura do seu crescimento varia entre os 20 e 35 °C, logo, o seu desenvolvimento se vê afetado em temperaturas baixas (BALARIN, HALLER, 1982; FAO, 2005). A grande atividade da tilapicultura no Brasil e o aumento na criação desses animais têm contribuído para surtos epizoóticos de certas doenças infecciosas (CARREON, 2018).

Uma das doenças preocupantes é ocasionada pela bactéria *Streptococcus agalactiae*, este agente é um dos principais microrganismos que causa uma doença conhecida como estreptococose em tilápias, trazendo grandes perdas econômicas na aquicultura, e sendo assim necessária a detecção rápida desta bactéria (KE *et al.*, 2014). *Streptococcus agalactiae* é um patógeno cosmopolita e o principal agente causador de septicemia e meningoencefalite em tilápias, tanto que surtos provocados por esta bactéria levam a altas taxas de mortalidade e morbidade dos peixes (MARCUSO; SALVADOR; DE ALMEIDA MARINHO-NETO, 2017).

Infecções causadas em tilápia por *S. agalactiae* ou também chamado como estreptococo do grupo B, constitui uma doença condicionada por fatores ambientais, entre eles, a alta temperatura e a má qualidade da água (PEPEY *et al.*, 2021). O nome dado para esta bactéria se deve a que ela contém o antígeno do grupo B de Lancefield, um polissacarídeo de superfície celular tipo-específico, essa especificidade de tipo é determinada pelo polissacarídeo capsular que determinam os antígenos capsulares e são fatores de virulência deste microrganismo (ROEHRS, 2012). Outro fator de virulência característico desta espécie é a enzima superóxido dismutase (SodA), um dato importante é que sequências do gene que codifica esta

enzima, podem ser utilizadas no desenho de *primers* específicos utilizados para diagnóstico.

Segundo Ke *et al.* (2014) “As estratégias mais comuns de profilaxia e tratamento da estreptococose são o uso de antibióticos, quimioterápicos e vacinas. Entretanto, a detecção rápida e precisa do patógeno é necessária para o controle da doença e para reduzir as perdas econômicas”. Métodos moleculares baseados em PCR têm sido desenvolvidos devido à sua elevada sensibilidade e especificidade frente aos métodos convencionais (JIMÉNEZ *et al.*, 2011; SEBASTIÃO, 2015).

Por outro lado, alternativas das técnicas de PCR vêm sendo estudadas como tentativa para diminuir custos e aumentar a praticidade, uma delas é a detecção por reação de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), que tem a vantagem de não precisar de um termociclador, sendo assim bastante prático para o uso em campo (COLQUHOUN; DUODU, 2011).

No trabalho dos autores Ke *et al.* 2014, o ensaio LAMP desenvolvido, se mostrou sensível e específico para a detecção de GBS em isolados de cultura e em amostras de tilápias doentes, o que pode ser útil para programas de monitoramento de longo prazo, como este ensaio é simples e não requer equipamentos sofisticados, a técnica LAMP pode potencialmente ser usada para triagem preliminar e vigilância de GBS em fazendas de tilápia.

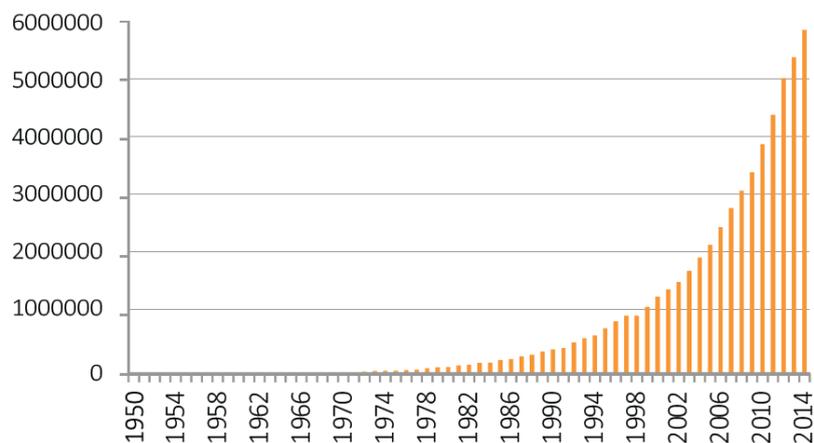
Diante disso, este trabalho teve como objetivo desenvolver e padronizar a técnica LAMP como método simples e rápido de diagnóstico de *Streptococcus agalactiae*, assim como também testar a especificidade dos *primers* utilizados para o estudo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 TILAPICULTURA NO BRASIL

A tilápia é um dos peixes mais produzidos, principalmente nas regiões do Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil, tanto assim que o país foi posicionado entre os maiores produtores de tilápia no mundo (SCHULTER; FILHO, 2018). A atividade iniciou aproximadamente nos anos de 1970, sendo a principal espécie produzida no Brasil, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), além da tilápia de Zanzibar (*Oreochromis hornorum*) (BOSCOLO *et al.*, 2001).

Na figura 1, observa-se o aumento da produção mundial de tilápia ao longo dos anos, já no Brasil somente a partir de 1990 a produção começou a aumentar, iniciando na região de Paraná tendo um foco industrial especialmente nas cidades de Toledo e de Assis Chateaubriand (SCHULTER; FILHO, 2018). Esse crescimento na produção, em parte, se deve à utilização de tanques de rede e que também com o passar do tempo houve melhoria na fabricação de rações, dando como consequência a resolução de certos problemas nutricionais das tilápias (BRANDÃO, 2018).

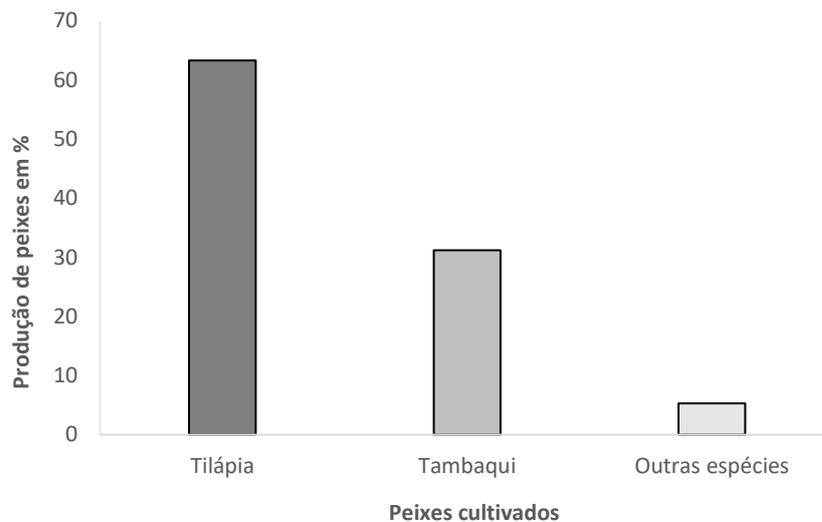


**Figura 1** - Produção mundial de tilápia desde seu registro em 1950 até 2014, em toneladas (t). Fonte: BARROSO *et al.*, 2018.

Uma característica marcante do Brasil, diferentemente de outros países produtores de tilápia, é que esta indústria atende sobretudo o mercado interno, já que aproximadamente 99% da produção é consumida no país. Este mercado é atendido de forma eficiente, devido a que a tilápia tem certos aspectos que facilitam o seu cultivo, entre eles se destacam a boa adaptação a diferentes sistemas de produção e

a adequação a diversas regiões geográficas, além disso este peixe tem grande resistência às alterações ambientais (BARROSO *et al.*, 2018).

Atualmente, segundo o último levantamento da Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR), o Brasil é o quarto maior produtor mundial de tilápia, espécie que representa 63,5% da produção do país. Os peixes nativos, liderados pelo tambaqui, participam com 31,2% e outras espécies com 5,3 % (Figura 2).



**Figura 2** - Porcentagem de produção de peixes cultivados no Brasil. Fonte: Adaptado de PEIXE BR, 2022.

## 2.2 TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis Niloticus*)

O nome tilápia é um nome popular utilizado para diversas espécies de peixes pertencentes à família que anteriormente era conhecida como ciclídeos. (KUBITZA, 2000). Estes peixes representam uma valiosa fonte de alimentos, e um dos gêneros mais relevantes é o *Oreochromis*, ao qual a tilápia do Nilo pertence, sendo *O. niloticus* a que comumente é reconhecida de fato como tilápia do Nilo, por ser rastreada há 4000 a.C. no Antigo Egito no rio Nilo (OSMAN *et al.*, 2021).

No Brasil, esta espécie foi introduzida em 1971 na região do Nordeste, sendo hoje cultivada desde a bacia do Rio Amazonas até o Rio Grande do Sul, isto porque a tilápia é um peixe potencial para a aquicultura, devido a que a ela possui uma alimentação onívora aceitando rações com bastante facilidade, além disso resiste a temperaturas altas e também à baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água, o que favorece ao seu crescimento e adaptação (BOSCOLO *et al.*, 2001).

Entretanto, o seu desenvolvimento ideal se dá entre 25 °C a 30 °C e seu crescimento se vê afetado abaixo dos 15 °C, não resistindo muitas vezes a temperaturas como 9 °C (MARQUES DA SILVA AYROZA, 2009).

O sucesso da sua introdução se deve a essa extrema plasticidade de alimentação, sendo um peixe filtrador, bastante eficiente, podendo ocupar uma variedade imensa de nichos ecológicos, além disso é uma espécie considerada como forte competidor territorialista, ocupando assim preferencialmente às margens de corpos d'água (TAVARES DIAS, 2019).

Apesar da grande adaptação que apresentam as tilápias, estes peixes são susceptíveis a diversas infecções provocadas por bactérias, por isso é necessário o conhecimento dos agentes causadores para que possa existir uma prevenção, visando a maior qualidade do produto e reduzindo as perdas na produção (ALBINATI *et al.*, 2006).

Sabe-se que o aumento da piscicultura e o crescimento da criação de tilápias no Brasil, têm criado condições propícias para o surgimento de surtos epizooticos de doenças infecciosas. Isso ocorre devido à alta densidade de estoque, que resulta em maior estresse nos peixes, ampla variação nos parâmetros ambientais e diversos erros de manejo (CARREON, 2018).

### 2.3 BACTÉRIAS PRESENTES EM TILÁPIAS

As doenças bacterianas representam uma grande preocupação para a piscicultura devido à natureza oportunista, fácil disseminação e capacidade de sobrevivência dessas bactérias em ambientes desfavoráveis (RIBEIRO, 2016), isto ocorre porque, quando as bactérias estão presentes na microbiota dos peixes e na água, elas podem ocasionar doenças quando o hospedeiro encontra-se debilitado. Embora existam muitas bactérias patogênicas, aquelas que apresentam maior impacto econômico e ocorrem com maior frequência são: *Aeromonas* spp., *Edwardsella* spp., *Flavobacterium columnare*, *Francisella* spp., *Streptococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* (LEIRA, 2017).

Alguns dos sinais clínicos em peixes infectados que indicam a presença de bacterioses podem ser: escurecimento do corpo, dificuldade respiratória, letargia,

natação irregular ou espiralada, assim como também alterações comportamentais. Além disso, eles também geralmente perdem o apetite (KUBITZA, 2005). Apesar de todos esses problemas, cabe ressaltar que a septicemia causada por bactérias do gênero *Streptococcus*, é considerada como uma das mais graves patologias nas criações intensivas de tilápia no Brasil e nos outros países, bem como o seu potencial patogênico (KUBITZA, 2008).

Sabe-se que os peixes também podem ser vias de transmissão de agentes patogênicos para os seres humanos. A penetração e estabelecimento de bactérias em diferentes tecidos e órgãos dos peixes, como brânquias, bexigas, rins e aparelho digestivo, têm sido relatados em ambientes aquáticos poluídos. Além disso, a bactéria *Escherichia coli*, mesmo não sendo habitante natural da microbiota de peixes, tem sido frequentemente isolada no estômago e intestinos desses animais (BARBOSA, 2010).

## 2.4 ESTREPTOCOCOSE

Uma das principais doenças que acometem o cultivo de peixes no mundo inteiro é a estreptococose, que pode ser causada por bactérias de diferentes gêneros e espécies que são capazes de lesionar o sistema nervoso central como, por exemplo, *Streptococcus parauberis*, *S. iniae*, *S. agalactiae* (TORANZO *et al.*, 2005; SALVADOR *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2009).

No Brasil, casos registrados de infecções de *Streptococcus* spp. em tilápias, se tornaram comuns, principalmente em tanques de rede e em períodos de temperatura elevada, sendo os sinais clássicos desta patologia a natação irregular, curvatura e escurecimento do corpo, olhos saltados opacos e com inflamação granulomatosa nas lentes, já na pele ocorre o aparecimento de áreas despigmentadas (KUBITZA, 2005).

Alguns estudos comprovaram a relação entre a temperatura e a progressão da estreptococose em tilápias do Nilo. Foram comparadas duas cepas de *S. agalactiae* submetidas a duas temperaturas distintas. Os resultados das análises dos metabólitos indicaram que, na temperatura de 35 °C, ocorre uma maior rapidez na multiplicação bacteriana, acompanhada pelo aumento de fatores de virulência e regulação da resposta ao estresse térmico (MORAES, 2017). Logo, a temperatura da

água é um fator ambiental importante na patogenicidade da estreptococose, pois temperaturas mais altas aumentam a taxa de mortalidade (KAYANSAMRUJ *et al.*, 2014).

No caso da transmissão desta doença, ocorre principalmente pela via horizontal. Isso ocorre por meio do contato direto entre peixes saudáveis e doentes, bem como pela contaminação bacteriana nos sistemas de cultivo ou pelo canibalismo dos peixes moribundos (AMAL *et al.*, 2013). É importante ressaltar que a bactéria também pode ser excretada pelas fezes de peixes infectados. Além disso, pode permanecer viva na coluna d'água, aumentando a possibilidade de transmissão fecal-oral (NGUYEN; KANAI; YOSHIKOSHI, 2002).

Em relação à transmissão vertical, JIMÉNEZ *et al.* (2011) não detectaram as bactérias nas larvas do peixe progenitor infectado (MARCUSO; SALVADOR; DE ALMEIDA MARINHO-NETO, 2017). Porém, estudos como o de Suebsing *et al.* (2013) conseguiram comprovar que a contaminação vertical de descendentes de reprodutores aparentemente saudáveis pode ocorrer. Além disso, peixes saudáveis podem ser portadores e transmitir a doença para tilápias virgens."

## 2.5 *Streptococcus agalactiae*

A bactéria *Streptococcus agalactiae* é um dos patógenos mais comuns na piscicultura mundial assim como também na brasileira, ela constitui uma ameaça para o desenvolvimento da indústria aquícola (RAMOS, 2020). Este microrganismo é considerado uma das bactérias mais patogênicas para uma variedade de peixes de água doce e salgada, incluindo a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (YI *et al.*, 2014). Além disso é capaz de atingir animais terrestres produzindo meningite neonatal em humanos e mastite em bovinos (GENG *et al.*, 2011).

Este patógeno, chamado também como estreptococo do grupo B devido a que contém o antígeno do grupo B de Lancefield, é caracterizado por apresentar células ovóides, gram positivas, catalase negativa, sendo microrganismos imóveis, não esporulados e anaeróbios facultativos (ROEHRS, 2012). Atualmente são conhecidos dez sorotipos (Ia, Ib, II até o IX), sendo que em animais os mais frequentes são o Ia, Ib e o II. No caso do Brasil a maioria dos surtos provocados por *S. agalactiae* estão associados ao sorotipo Ib (RAMOS, 2020).

Embora a fisiopatologia da infecção causada por *S. agalactiae* ainda não esteja completamente esclarecida, estudos indicam que esse patógeno é capaz de causar necrose local ao invadir e se multiplicar dentro de macrófagos, espalhando-se pela corrente sanguínea e disseminando-se nos órgãos, resultando em septicemia (RIBEIRO, 2016).

Os sinais clínicos desta doença causada por esta bactéria, incluem anorexia, natação errática, escurecimento da pele, letargia, exoftalmia e opacidade de córnea uni ou bilateral, curvatura do corpo, ulcerações da epiderme, entre outros (MARCUSO *et al.*, 2015). Logo, analisando o grande problema das infecções estreptocócicas na cadeia de valor da tilápia e os potenciais riscos zoonóticos, ferramentas de diagnóstico fáceis, confiáveis e menos dispendiosas particularmente para áreas remotas em países tropicais se fazem muito necessárias (PEPEY *et al.*, 2021).

## 2.6 DIAGNÓSTICO CLÍNICO MOLECULAR

### 2.6.1 PCR

A técnica de PCR apresenta várias aplicações dentro do âmbito da pesquisa científica e é utilizada amplamente em estudos moleculares, visto que oferece uma facilidade relativa para amplificar *in vitro* regiões específicas do genoma de qualquer organismo (OLIVEIRA, 2007). Existem diferentes tipos de PCR, especificamente a PCR convencional não quantifica se comparada com a PCR em tempo real, pois a qPCR é capaz de quantificar o número de moléculas produzidas por cada ciclo (CAMPOS, 2010).

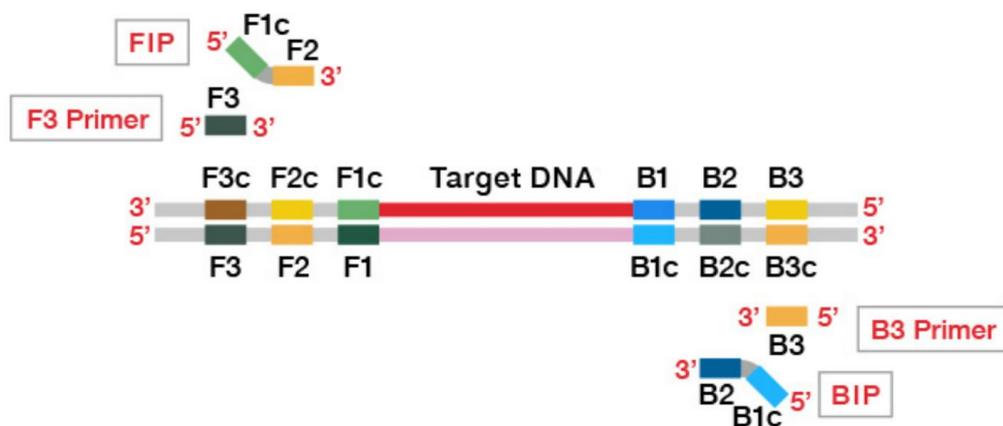
O princípio da técnica é multiplicar trechos específicos de DNA, essa multiplicação se dá de forma alternada e por etapas (HAAS; TORRES, 2016). A primeira etapa consiste na separação da fita dupla de DNA, sendo aplicada uma temperatura de 95 °C, já na segunda etapa ocorre o anelamento dos iniciadores, a temperatura é reduzida (o valor depende da temperatura de melting ( $T_m$ ) e cada iniciador tem um  $T_m$  específica), na terceira etapa ocorre a extensão, com uma temperatura de aproximadamente 72 °C, temperatura ideal para a atividade da Taq DNA polimerase que adiciona os dNTPs para fazer uma nova fita e o ciclo se repete novamente (CHIARI, 2010).

Como esta técnica dá a possibilidade de obter milhões de cópias, ela facilita a análise genética, permitindo assim o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico muito mais sensíveis e mais específicas que testes bioquímicos e sorológicos, analisando um grande número de amostras simultaneamente, o que faz que seja um método atrativo para estudos epidemiológicos de microrganismos causadores de doenças (LIVAK *et al.*, 1995).

Apesar da PCR ser bastante utilizada para diagnóstico, ela requer bastante tempo e no final da reação menos cópias são produzidas se comparadas com uma técnica molecular que vem sendo bastante utilizada recentemente, que é o ensaio LAMP, além disso a PCR é mais sensível à inibidores da reação se comparados com esta outra técnica (LEIN, 2022).

### 2.6.2 LAMP

A técnica de LAMP consiste na amplificação do DNA utilizando a enzima Bst DNA polimerase e, no mínimo, dois pares de *primers*. Conforme observado na figura 3, os *primers* internos incluem o FIP e o BIP, enquanto os externos são o F3 e o B3. Esses *primers* são projetados a partir da sequência alvo que se deseja amplificar (GONÇALVES, 2014). Os iniciadores participam de duas etapas, uma cíclica e outra não cíclica, formando fitas simples de DNA em forma de haltere com alça em ambas extremidades, realizando assim a produção exponencial de *amplicons* de comprimentos variáveis (RIBEIRO *et al.*, 2022).

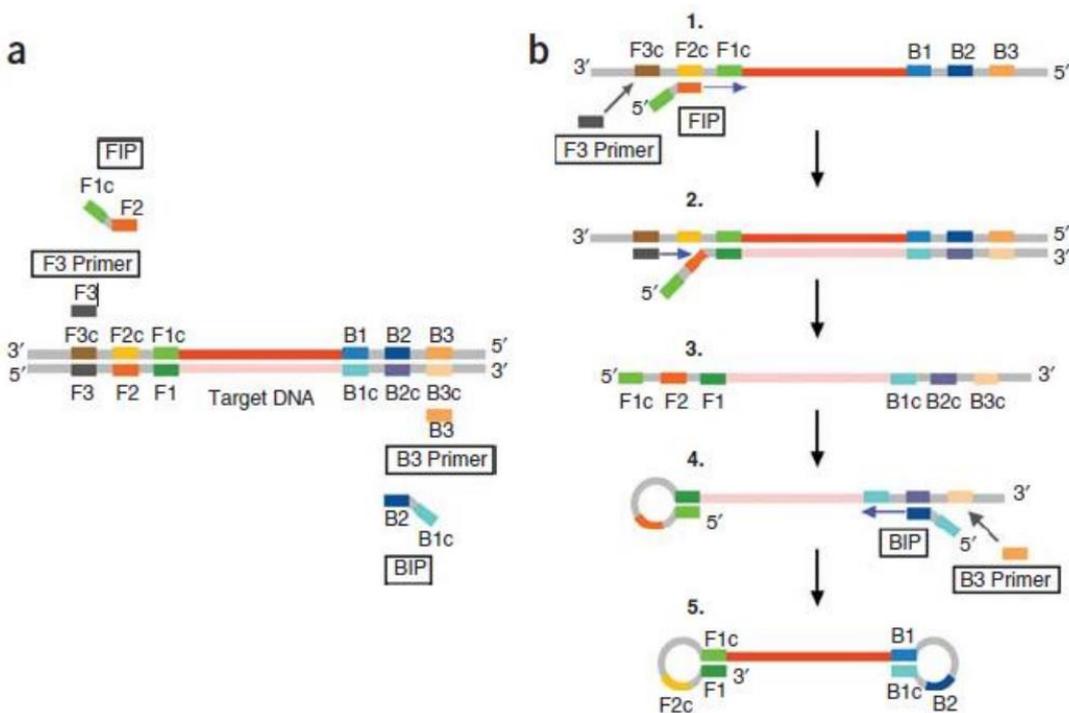


**Figura 3** - Esquema dos *primers* FIP, BIP, F3 e B3 e as regiões de ligação da fita alvo (F1c, F2c, F3c, B1c, B2c e B3c). Fonte: Eiken Chemical Co. Ltd.

- Etapa não cíclica da LAMP:

Primeiramente, ocorre a etapa não cíclica, na qual é produzido o alvo. Esse processo se inicia pela ação do *primer* interno FIP (interno de sentido direito), que possui uma região complementar que vai se ligar ao alvo F2c. Além disso, o *primer* interno FIP possui uma porção sintética que será incorporada à nova fita a ser gerada pela polimerase. Em seguida, o *primer* externo F3 reconhece a região específica F3c, que está localizada anteriormente à região F2c do alvo, e se liga a ela, direcionando a enzima para iniciar a extensão da nova fita. Nesse processo, a fita sintetizada pelo *primer* FIP é deslocada simultaneamente (OLIVEIRA, 2016).

Após isso o mesmo processo acontece com os *primers* BIP (*primer* interno sentido reverso) e B3, já que o BIP é complementar à B2c e possui também uma região sintética e o B3 que é complementar a uma região anterior ao B2c. Após a ação desses quatro *primers*, o resultado é a fita de DNA com estruturas em loop (alças) nas duas pontas, estas dobras são dadas pelas porções sintéticas inseridas nas novas fitas como se observa na figura 4 (LEIN, 2022).



**Figura 4** - Esquema da etapa não-cíclica da LAMP. A) Desenho das seis regiões distintas da sequência alvo (F3c, F2c, F1c, B1, B2 e B3) e os *primers*. B) Início da etapa não-cíclica e formação das alças. Fonte: Oliveira, 2016.

- Etapa cíclica da LAMP:

A partir das fitas em loop, o alvo pode ser amplificado na etapa chamada de cíclica, ou seja, aqui começa o segundo momento da reação que é marcada pela ciclagem e amplificação, acontece quando o FIP se anela a uma porção complementar da alça e dá início a uma nova síntese, libera a fita anterior e forma outra estrutura em *loop*. Depois a mesma situação acontece com o BIP (LEIN, 2022).

O terceiro momento é o da elongação e reciclagem, onde, a partir das alças formadas, as reações de síntese por deslocamento de fitas são sequencialmente repetitivas, produzindo exponencialmente inúmeros produtos de amplificação. Isso resulta em produtos finais que não são cópias lineares de fita dupla ou simples, mas sim de diferentes proporções, logo, é possível a obtenção de várias cópias do alvo, com múltiplos loops em uma mesma fita, em escala de  $10^9$ , isso em menos de 1 hora (GONÇALVES, 2014).

Além dos dois *primers* internos (FIP e BIP), existem outros dois *primers* chamados de LF (Alça Anterior) e LB (Alça Posterior). Esses *primers* são complementares às sequências localizadas entre as regiões F1 e F2 e B1 e B2, que são regiões não acessadas pelos *primers* internos, e que quando acessadas são capazes de acelerar a reação de amplificação para finalizá-la com mais quantidade de DNA e com maior rapidez (RIBEIRO *et al.*, 2022).

Todo este processo é possível devido a utilização da *Bst* DNA polimerase, que é responsável pela amplificação isotérmica do gene alvo, ocorrendo em temperaturas aproximadas de 55 a 65 °C. Isso permite que a reação seja realizada em um banho-maria, dispensando a necessidade de um termociclador. O tempo de reação é em torno de 60 minutos, e o resultado pode ser obtido no mesmo tubo através de uma reação colorimétrica (NUNES *et al.*, 2013). Dadas essas condições da realização da técnica, a sua simplicidade levou ao seu uso na detecção de diferentes patógenos bacterianos e virais de peixes, por isso, o método poderia ser utilizado potencialmente em campo (CAIPANG *et al.*, 2010).

- LAMP e a detecção de patógenos:

O ensaio LAMP, se mostrou sensível e específico a vários patógenos como por exemplo, a bactéria causadora da Peste, detectando até 10 pg de DNA de *Yersinia pestis* (NUNES *et al.*, 2013). A técnica também se mostrou específica, sensível e de baixo custo para a detecção da espécie *Wolbachia pipientis*, uma bactéria intracelular que infecta artrópodes e alguns nematódeos, causando alterações reprodutivas em seus hospedeiros (GONÇALVES, 2014). Sendo assim também uma alternativa promissora para a detecção de *S. agalactiae*.

- Detecção Visual do Ensaio:

O resultado do teste pode ser visualizado pelo método da turbidez, uma vez que o subproduto da LAMP é o pirofosfato de magnésio, que causa a precipitação e conseqüentemente a turbidez da solução, servindo como indicador de resultado positivo (RIBEIRO *et al.*, 2022). Outro método bastante eficiente é a detecção com agentes intercaladores de DNA, que auxiliam na confirmação da amplificação, possibilitando uma análise rápida e simples. Os marcadores fluorescentes apresentam afinidade pelas bases de DNA, interagindo assim com as cópias dos fragmentos amplificados e gerando fluorescência. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de fitas de DNA intercaladas, sendo a presença de fluorescência um resultado positivo e a ausência um resultado negativo (MAO *et al.*, 2012; BHIMANI *et al.*, 2015).

Além disso, a detecção visual pode ser realizada por colorimetria, que ocorre através da mudança de cor da reação induzida pela alteração no pH. Um exemplo disso é o uso do corante Phenol Red. Essa substância altera a coloração de rosa para amarelo devido à mudança de pH que ocorre pela síntese dos *amplicons* e pela liberação dos prótons H<sup>+</sup>, que acidificam a reação. Portanto, é considerado um resultado positivo se houver mudança de pH (YOSHIKAWA, 2022).

Também é utilizada a detecção por íons metálicos, como o cálcio e o magnésio. Exemplos disso são a utilização do *hydroxy naphthol* azul (HNB) e a calceína (ZHANG *et al.*, 2014). O *hydroxy naphthol* azul (HNB) é um indicador de metal que muda de cor de acordo com a concentração de Mg<sup>2+</sup> na solução. Na ausência de Mg<sup>2+</sup>, apresenta um pico de absorção em 650 nm, o qual diminui à medida que a

concentração desse íon aumenta. Dessa forma, o HNB promove a alteração da cor da solução, passando de violeta em concentrações mais altas de  $Mg^{2+}$  para azul celeste à medida que a concentração desse íon diminui devido à precipitação como pirofosfato de magnésio (ZATTI, 2016).

Por outro lado, a calceína combinada com íons de manganês é capaz de gerar fluorescência no processo de amplificação. A amplificação resulta na formação de íons de pirofosfato como subproduto, os quais se ligam e removem os íons de manganês da calceína, desencadeando a emissão de fluorescência. A intensidade da fluorescência é ainda mais acentuada quando a calceína se associa aos íons de magnésio (TOMITA *et al.*, 2008).

### 3 OBJETIVOS

#### GERAL

Desenvolver o ensaio LAMP como um método de detecção simples e rápido da bactéria *Streptococcus agalactiae* que infecta as Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) causando a doença conhecida como Estreptococose.

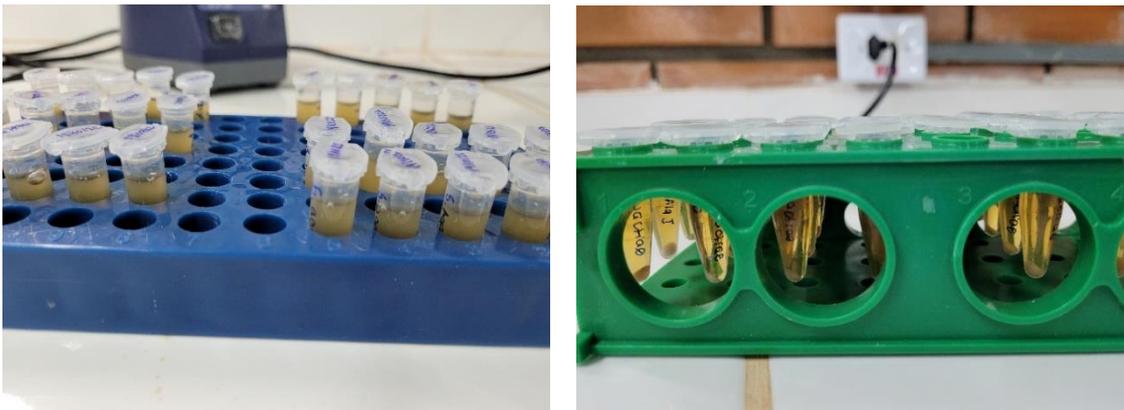
#### ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica LAMP qualitativa para a identificação de *Streptococcus agalactiae*, utilizando amostras criopreservadas, otimizando assim as condições de reação, incluindo a temperatura e o tempo de incubação.
- Avaliar a especificidade dos *primers* para *S. agalactiae* através da utilização de outras cepas bacterianas que são comumente encontradas em ambientes de cultivo de tilápias.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 CEPAS BACTERIANAS

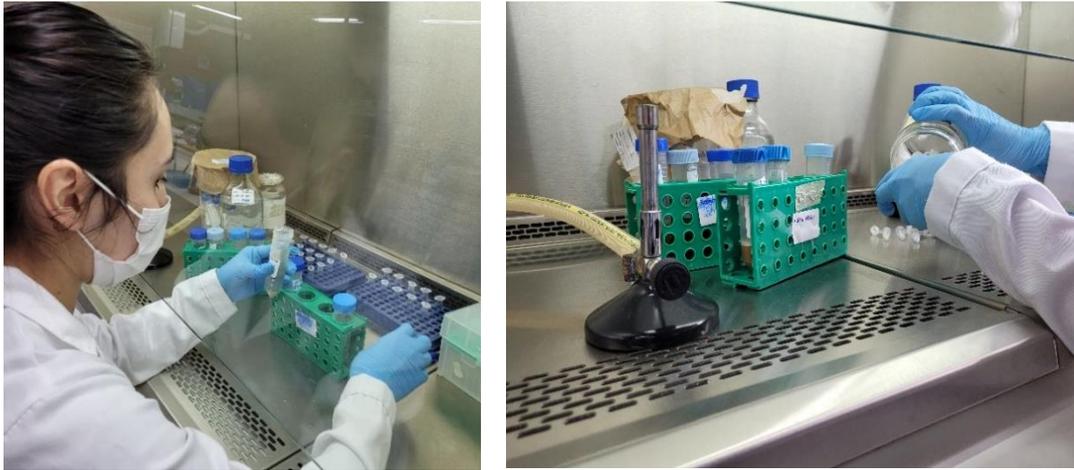
Para o estudo foram selecionadas cinco culturas bacterianas, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, que são provenientes de um banco de isolados criopreservados com as principais espécies circulantes nos tanques de produção do Oeste do Paraná, sendo já previamente identificadas por testes bioquímicos convencionais e pelo sistema automatizado VITEK®2 Compact. Estas bactérias se encontram preservadas em solução salina 0,9% e glicerol, armazenados em freezer -80 °C no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Universidade da Integração Latino-americana (UNILA). Por outro lado, as amostras de *Escherichia coli* são provenientes do banco de cepas da UNILA, sendo conservadas em meio LB com 50 % de glicerol (Figura 5).



**Figura 5** - Bactérias criopreservadas sendo preparadas para reativação.

### 4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As culturas de *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, foram reativadas por semeadura em meio de cultura Extrato de Levedura e posteriormente incubadas a 37 °C por 24 h. Para a semeadura de *Escherichia coli*, foi utilizado o meio caldo nutriente e em seguida incubada a 30 °C por 24 h (Figura 6 e 7).



**Figura 6** - Reativação e cultivo das bactérias.



**Figura 7** - Cultivos bacterianos em meio Extrato de Levedura.

#### 4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA das 5 cepas utilizadas *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, foi realizada através de um protocolo adaptado do Kit de Extração Geno Plus Genomic DNA Sistema Miniprep (Viogene). Inicialmente, os pellets bacterianos foram ressuspensos, utilizando para cada amostra 300 µl de PBS estéril para assim depois adicionar 1000 µl de tampão RL, incubando por 5 minutos para a lise ocorrer. Logo após, foi adicionado 20 µl de solução de Proteinase K e também 180 µl de tampão de lise (LYS Buffer), e em seguida homogeneizado, para assim partir para incubação durante 30 min a 60 °C. Posteriormente, foram adicionados e misturados 300 µl de

tampão FX, seguido de 200 µl de etanol 100 %. Esse preparado foi transferido para uma coluna B/T Genomic, específica do Kit, logo centrifugado a 8000 rpm por 2 min. O tubo coletor foi então descartado, a coluna colocada em um novo tubo coletor e acrescida de 500 µL de tampão de lavagem WS e centrifugado a 8000 rpm por 2 min e após isso descartado o líquido que passou pela membrana de sílica (etapa realizada duas vezes). A coluna foi transferida para um novo microtubo para eluir o DNA em 200 µl de solução tris EDTA pré-aquecida a aproximadamente 70 °C, deixando assim a coluna vertical por 1 a 5 min, em seguida, centrifugado na velocidade máxima por 1 a 2 min para eluir o DNA. A dosagem do DNA foi realizada com o equipamento NANODROP ONE<sup>C</sup> Thermo scientific e as amostras foram armazenadas em -20 °C.

#### 4.5 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO LAMP

Inicialmente, para a padronização da técnica, foram utilizados 3 pares de *primers* como se observa na tabela 1.

**Tabela 1** - *Primers* a ser utilizados para detecção de *S. agalactiae*.

<b>Primer</b>	<b>Sequência (5'→ 3')</b>
F3	ATATGATGCGCTTGAGCC
B3	ACCACCGTTATTGATGACTG
FIP	GAGCAGCATTTCATTAGCAACATATTTTGATGCTGAGACAATGACAC
BIP	ACATCCTGAAATTGGAGAAGACTTTTTTCCTGACGAATATCTTCTGGAAT
LF	TGCATGGTGCTTATCATGATGT
LB	AGGCGCTCTTAGCTGATGT

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Os *primers* utilizados foram feitos utilizando como base o trabalho de Pepey *et al.* (2021), eles foram projetados por Suebsing *et al.* (2013) baseados na sequência de consenso do gene da superóxido dismutase (*sodA*) (Tabela 1).

Para a padronização da reação foram utilizadas 3 temperaturas de amplificação 55 °C, 60 °C e 65 °C, o tempo de incubação foi de 1 hora e o tempo de parada da reação 2 min a 90 °C, utilizando como base os parâmetros mais citados dentro da literatura (Figura 8). As amostras utilizadas para o teste de padronização foram *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* e o controle negativo (Tabela 2).

**Tabela 2** - Temperaturas e amostras testadas para a padronização da LAMP.

Temperaturas da padronização		
55 °C	60 °C	65 °C
<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>
<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
Controle Negativo	Controle Negativo	Controle Negativo

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

**Figura 8** - Amostras testadas nas temperaturas de 65 °C e 60 °C.

A reação foi feita com seguindo os parâmetros do fabricante do Kit *Bst* 2.0 DNA Polymerase (New England BioLabs), o volume total da reação foi de 25 µl contendo o tampão 10x isothermal amplification buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Tween® 20) com concentração final de 1x, 6 mM de MgSO<sub>4</sub>, 2 mM de cada dNTP, betaína 0,8 M, 8 U de *Bst* 2.0 DNA Polymerase. Já para os *primers* foi utilizada uma concentração de 0,2 µM para F3 e B3, 1,6 µM de FIP e BIP e 0,4 µM de LF e LB como se observa na tabela 3. Por último, para a análise dos resultados foi utilizado o reagente SYBR Green diluído em 1:10 (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentrações para reação de LAMP. *S. agalactiae*.

REAGENTES	Concentração do reagente	Concentração desejada	Volume Final (de uso por amostra)
H <sub>2</sub> O	-	-	7 µL
Tampão Ishotermico termophol 10X	10x	1x	2,5 µL
Betaina	10M	0,8 M	2 µL
MgSO <sub>4</sub> (100mM)	100 mM	6 mM (8 mM total)	1,5 µL
dNTPs	10 mM	2 mM	0,5 µL de cada
F3 e B3	100 mM	0,2 µM	1µL
FIP e BIP	100 mM	1,6 µM	1µL
FLP e BLP	100 mM	0,4 µM	1µL
<i>Bst</i> Polimerase	8000 U	8 U	1µL
DNA	-	-	3 µL
<b>TOTAL</b>			<b>25 µL</b>

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

#### 4.6 ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS

Após a padronização do ensaio LAMP, foram realizados experimentos com outras bactérias presentes no ambiente como *E. coli* e bactérias causadoras de doenças em tilápias como *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* e o patógeno de interesse *Streptococcus agalactiae*, para assim avaliar a especificidade dos primers F3, B3, FIP, BIP, LF e LB (Figura 9).



Figura 9 - Primers FIP, BIP, F3, B3, LB e LF.

O experimento foi realizado duas vezes e as condições de reação foram as mesmas utilizadas para a padronização como se observa na tabela 3, sendo a temperatura da reação 60 °C durante 1 h e o tempo de parada da reação foi de 2 min a uma temperatura de 90 °C, além das bactérias foi utilizado um controle negativo na reação usando água livre de nucleases (Figura 10).



**Figura 10** - Teste da especificidade dos *primers* seguindo os padrões do fabricante para a execução da LAMP.

## 5 RESULTADOS

Foi realizado o procedimento de detecção molecular de *Streptococcus agalactiae*, que incluiu a extração de DNA das bactérias. Em seguida, foi feita a padronização do Ensaio LAMP utilizando *Aeromonas hydrophila*, *S. agalactiae* e um controle negativo para cada temperatura testada. Após determinar a temperatura ideal para o ensaio, foi conduzido o teste de especificidade dos *primers*. Amostras de DNA das cinco espécies de bactérias foram utilizadas, e os resultados correspondentes podem ser observados nos respectivos tópicos.

### 5.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a realização do ensaio LAMP foi extraído o DNA das amostras, na tabela pode ser observada a quantidade e a pureza de DNA medida com o equipamento NanoDrop (Tabela 4).

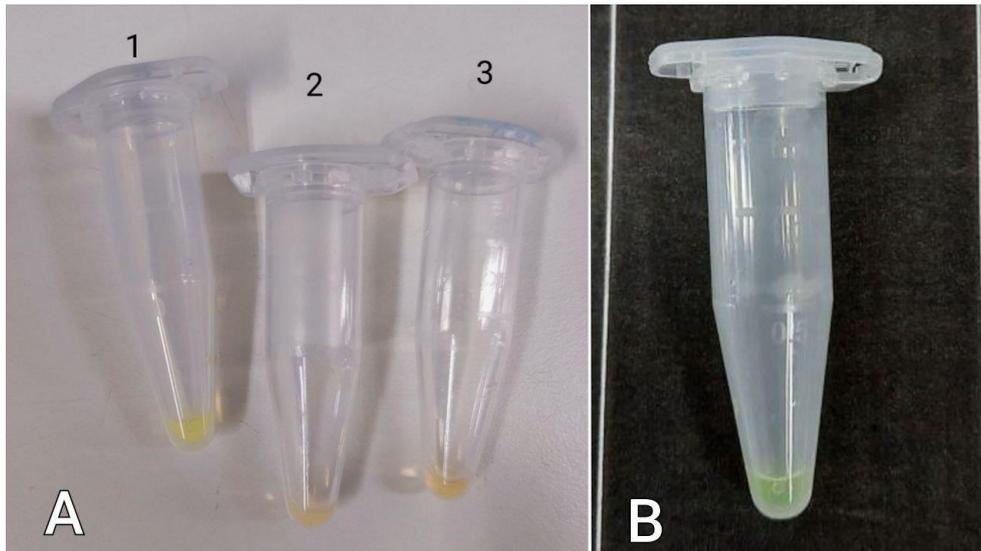
**Tabela 4** - Resultado da extração e dosagem do DNA das amostras.

Amostras	ng/ $\mu$ L	A260/A280	A260/A230
<i>Streptococcus agalactiae</i>	178.15	2.23	0.24
<i>Aeromonas sobria</i>	26	1.95	0.37
<i>Aeromonas hydrophila</i>	125.8	1.93	0.59
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	249.9	2.03	0.85
<i>Escherichia coli</i>	143.9	2.22	1.12

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

### 5.2 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO LAMP

Dentre os resultados da padronização utilizando as 3 temperaturas diferentes 55 °C, 60 °C e 65 °C, observou-se que a amplificação ocorreu na temperatura de 60 °C, sendo esta a temperatura ótima para as condições utilizadas. O teste colorimétrico utilizando SYBR Green I mostra a coloração esverdeada de um dos tubos, correspondente a amostra de *S. agalactiae*, indicando a ocorrência de amplificação (Figura 11).

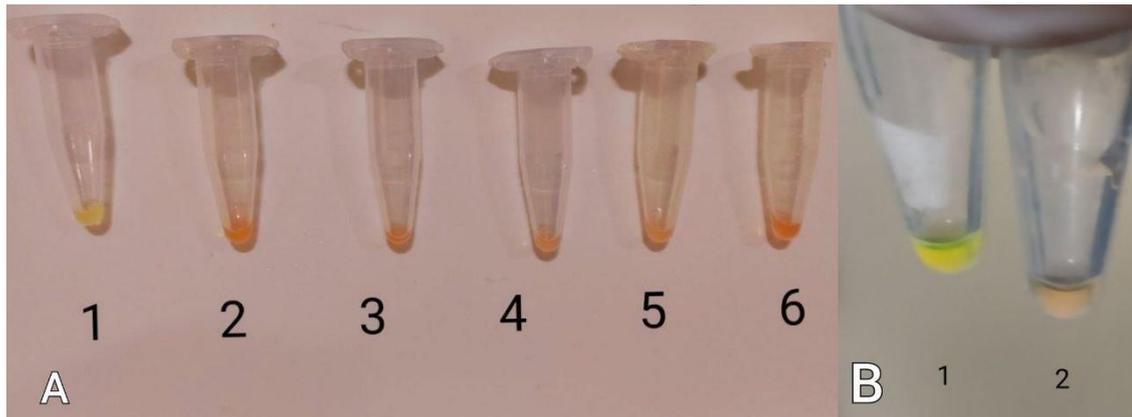


**Figura 11** - Visualização a olho nu da mudança de coloração das amostras. **(A)** Se observa as 3 amostras testadas na temperatura de 60 °C sendo a (1) *S. agalactiae* positiva e as outras duas amostras negativas com uma coloração alaranjada, (2) *A. hydrophila* e (3) o controle negativo. **(B)** Aqui se observa a amostra de *S. agalactiae* com coloração verde indicando a presença de amplificação.

No teste de padronização não houve reação cruzada, a amostra (2) de *Aeromonas hydrophila* mostrou um resultado negativo para amplificação, assim como o controle negativo, onde também não foram detectados *amplicons*. Esses resultados indicam que a temperatura de 60 °C foi adequada para as condições da reação, pois não houve amplificação indesejada e os controles negativos deram resultados esperados.

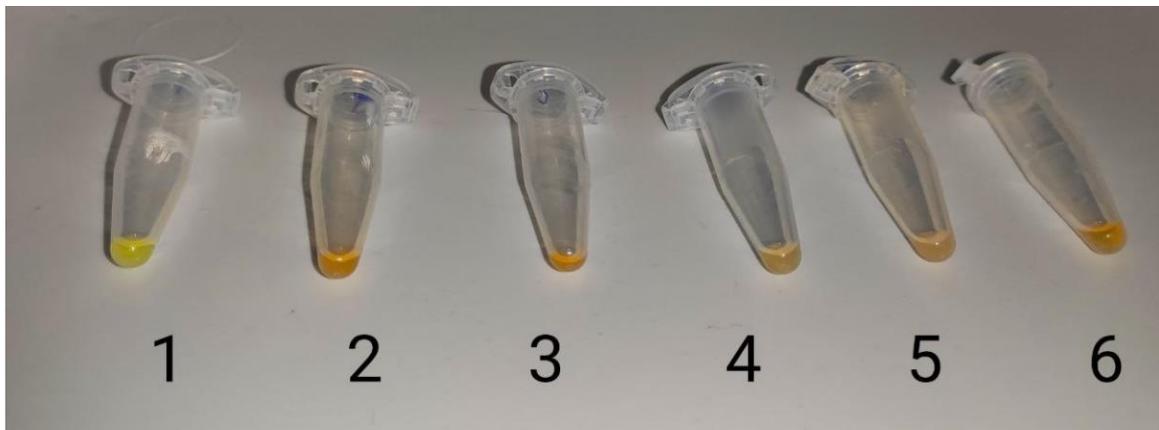
### 5.3 ESPECIFICIDADE DOS *PRIMERS*

No teste de reação cruzada, no primeiro experimento realizado foi possível observar que as amostras 2, 3, 4, 5 e 6 tiveram uma coloração alaranjada o que indica a ausência de *amplicons* como era esperado, ou seja, não houve amplificação inespecífica do material genético de outras espécies. Por outro lado, a amostra 1 teve uma coloração verde, indicando um resultado positivo (Figura 12).



**Figura 12** - Visualização a olho nu da mudança de coloração nas amostras. **(A)** Aqui se observa que a amostra (1) *Streptococcus agalactiae*, adquiriu uma coloração verde mostrando-se positiva para a presença de *amplicons* enquanto a amostra (2) *Aeromonas sobria*, (3) *Aeromonas hydrophila*, (4) *Klebsiella pneumoniae*, (5) *Escherichia coli* e (6) Controle Negativo, apresentaram coloração alaranjada indicando ausência de amplificação **(B)** Pode-se observar uma imagem ampliada do resultado positivo para (1) *S. agalactiae* e (2) o Controle Negativo na coloração alaranjada sem amplificação.

Os resultados da repetição do experimento mostraram que novamente houve amplificação somente para *S. agalactiae* e ausência de *amplicons* para as outras amostras de bactérias testadas (Figura 13).



**Figura 13** - Detecção visual das amostras. Pode-se observar que a amostra de (1) *Streptococcus agalactiae* é positiva para a amplificação e as amostras (2) *Aeromonas sobria*, (3) *Aeromonas hydrophila*, (4) *Klebsiella pneumoniae*, (5) *Escherichia coli* e (6) Controle Negativo, são negativas.

## 6 DISCUSSÃO

Sabe-se que aproximadamente 50 países, exceto a Antártica, criam a tilápia do Nilo para fins de consumo. Por isso, *O. niloticus* ocupa o sexto lugar entre as espécies cultivadas, que servem não só como fonte de alimento, mas também como fonte de empregos, sendo de grande importância na economia de vários países (OSMAN *et al.*, 2021). Porém, existem uma série de doenças que podem comprometer a criação destes peixes, entre elas uma causada por *Streptococcus agalactiae*, bactéria considerada como uma ameaça à saúde pública, podendo infectar humanos por lesões acidentais durante o manuseio de peixes frescos contaminados (SUEBSING *et al.*, 2013).

Diante deste cenário, é crucial a detecção de patógenos para diagnosticar este tipo de doenças e poder administrar o tratamento adequado. Por exemplo, a utilização de antibióticos para o tratamento de infecções por *Streptococcus* spp. ainda é um pouco controversa, pois estudos demonstraram que esta bactéria pode sobreviver no interior de macrófagos, onde muitas drogas antimicrobianas não conseguem atingi-la (RIBEIRO, 2016). Embora os testes bioquímicos sejam importantes ferramentas para detecção, os testes moleculares, como a PCR, ribotipagem e métodos novos, como o ensaio LAMP, são necessários para confirmar as identificações das espécies (SUEBSING *et al.*, 2013).

Esta última técnica apresenta uma série de vantagens, atraindo a atenção dos pesquisadores, pois a reação pode ser realizada em qualquer laboratório com o uso de equipamentos simples, como banho-maria ou banho seco. Além disso, tem curta duração, alta sensibilidade e seletividade na amplificação. Não requer o processo de desnaturação da amostra de DNA por temperatura e é menos sensível a inibidores de reação em comparação com a PCR. Também, os resultados podem ser observados a olho nu (LEIN, 2022). Isto foi visto no experimento, onde o método utilizado foi o de coloração com SYBR Green I. Após a parada da reação e a adição da substância, a mudança de coloração ocorreu de forma instantânea, permitindo a visualização do resultado positivo para a presença de *Streptococcus agalactiae*, que apresentou coloração verde. As amostras negativas das outras bactérias em teste apresentaram uma coloração alaranjada (Figura 11 e 12).

Além disso, existem estudos como os de Pepey *et al* (2021), onde a LAMP foi combinada com a tecnologia *FTA* utilizando os cartões chamados *FTA elute* para o diagnóstico de *S. agalactiae*, simplificando a coleta de amostras sendo uma abordagem atraente para atividades de trabalho de campo em áreas tropicais, se apresentando como uma alternativa prometedora para melhorar manejo da saúde nas fazendas de peixes. Logo, a LAMP pode ser utilizada desde em laboratórios com infraestrutura mais simples até em campo.

A padronização da técnica foi rápida e simples. Após consultar a literatura, foram escolhidas três temperaturas para a padronização: 55 °C, 60 °C e 65 °C. O tempo mais citado foi de 1 hora, e a temperatura de parada da reação foi de 90 °C por 2 minutos. O resultado obtido foi a amplificação a 60 °C. No experimento realizado, não houve amplificação na temperatura de 65 °C, que foi a temperatura de amplificação mencionada no artigo-base dos *primers*. Isso pode ser devido ao fato de que uma técnica molecular possui vários parâmetros que podem afetar a reação. Assim como a PCR, a LAMP é uma técnica molecular e seu desempenho pode ser influenciado não apenas pela concentração de *primers* e pela temperatura, mas também pela concentração de diferentes reagentes, especialmente desoxinucleotídeos, cloreto de magnésio e a enzima (OLIVEIRA, 2009).

Um dos grandes desafios para uma reação altamente eficiente de LAMP é o design dos *primers* espécie específicos. Esses *primers* devem atender a certos critérios, como porcentagem de G/C, concentração, localização dos pares de nucleotídeos e distância entre regiões do DNA. Além disso, eles não devem criar uma estrutura de fita dupla na temperatura que será usada no experimento ou dentro da faixa na qual amplifica a *bst* polimerase (LEIN,2022). Dado isso, apesar de que os *primers* foram baseados no trabalho de Pepey *et al*. (2021), é crucial realizar o teste de especificidade dos *primers* para verificar se não existe reação cruzada, além de que especialmente na LAMP deve ser feita uma escolha de regiões de anelamento dos iniciadores na extremidade 3' de F3; F2; B2 e B3 e na 5' de F1c e B1c, que garantam suficientes incompatibilidades entre a espécie alvo e as não-alvo (NOTOMI *et al.*, 2000).

Os resultados mostraram que os *primers* FIP, BIP, F3, B3, LF e LB foram específicos para a amplificação da amostra de *S. agalactiae*, não havendo

amplificação cruzada. O tubo contendo a amostra de *Streptococcus agalactiae* adquiriu coloração verde após adição do corante SYBR Green I, enquanto as amostras de *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e o Controle Negativo permaneceram com coloração alaranjada, indicando resultado negativo (Figura 12 e 13).

No desenvolvimento do Ensaio LAMP para este estudo, foi utilizado o corante SYBR Green I a diferença do artigo-base de Pepey *et al.* (2021), onde utilizaram *Phenol Red* como método de visualização. O uso do *Phenol Red* na detecção visual da LAMP possui algumas limitações, como menor sensibilidade em comparação ao SYBR Green I. Além disso, a interpretação dos resultados pode ser subjetiva, pois a mudança de cor pode não ser tão visível quanto a do SYBR Green I (WONG *et al.*, 2015). Isto porque o corante SYBR Green I, é capaz de detectar baixas concentrações de DNA amplificado, tornando-o altamente sensível para a detecção de produtos de amplificação na técnica LAMP e tem facilidade de uso, já que é de fácil aplicação, não exigindo equipamentos complexos ou procedimentos complicados. Basta adicionar o corante à reação e visualizar os resultados (MORI *et al.*, 2001).

Apesar da coloração com SYBR Green I ser um método simples, ele tem uma desvantagem em relação aos outros métodos colorimétricos, se ele for adicionado no início da reação, este corante inibe a reação de amplificação, impossibilitando a sua adição prévia na reação (MAO *et al.*, 2012). Por isso, ele deve ser colocado após a reação de amplificação ter ocorrido, entre tanto, isso pode aumentar o risco de contaminações já que a LAMP atinge a escala de  $10^9$  cópias (GONÇALVES, 2014).

Para a visualização dos resultados neste trabalho, não foi utilizada a eletroforese com gel de agarose, pois a diferença da PCR convencional, a LAMP forma bandas de diferentes tamanhos e pesos moleculares, já que seus produtos são estruturas variadas, sendo também uma alternativa lenta e com risco de contaminações cruzadas entre as amostras devido a grande quantidade de *amplicons* gerados na reação, não sendo o método de detecção mais recomendado (CHAOUCH, 2021).

Desde a realização da reação até o método de visualização, a LAMP se mostrou uma técnica rápida e simples de ser realizada. Além disso, em relação ao custo, no trabalho de Ximenes (2021) e também no estudo de Gonçalves (2014), resultados similares foram obtidos. O custo do ensaio LAMP se mostrou aproximadamente 53,92% menor em relação à PCR convencional. Já no trabalho de Silva (2019), foi feita uma comparação entre o diagnóstico de RT-LAMP para o vírus ZIKA em comparação com a técnica de qRT-PCR. O custo por reação da LAMP foi de aproximadamente R\$ 1,00, e o da qRT-PCR R\$ 43,00 mais caro, além de se mostrar mais sensível que a técnica padrão-ouro para o diagnóstico dessa doença.

Neste trabalho, não foi incluída a PCR nos experimentos como método comparativo, porém é importante ressaltar que, como é o método molecular mais utilizado atualmente, cabe mencionar, de forma comparativa, as vantagens e desvantagens de ambos os métodos. Em resumo, a LAMP se mostrou mais sensível e específica em diversos estudos, além de apresentar custo mais baixo. Isso se aplica tanto em comparação com a PCR convencional quanto com a qPCR no diagnóstico de vários patógenos.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível desenvolver o ensaio LAMP como um método simples e rápido para a detecção de *Streptococcus agalactiae*, que infecta tilápias do Nilo. Além disso, a técnica foi padronizada otimizando as condições de reação. Os *primers* FIP, BIP, F3, B3, LF e LB demonstraram especificidade para a detecção de *S. agalactiae* em relação a outros patógenos comumente encontrados em tilápias e no ambiente em que vivem. Esses resultados foram obtidos utilizando amostras de bactérias previamente isoladas e criopreservadas.

Recomenda-se, como perspectiva para pesquisas futuras, a utilização de amostras frescas de tecido de tilápias infectadas para verificar outros parâmetros, como a sensibilidade do teste. Também, seria interessante avaliar os custos do diagnóstico de *S. agalactiae* em comparação com outros métodos moleculares disponíveis.

## REFERÊNCIAS

- ALBINATI, A. C. L. *et al.* Edwardsielose em Tilápias do Nilo (*Oreochromis Niloticus*). **Rev. Bras. Saúde Prod. An**, p. 164–168, 2006.
- AMAL, M. N. A *et al.* R. Transmission of *Streptococcus agalactiae* from a hatchery into a newly established red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) × *Oreochromis mossambicus* (Peters), farm. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, n.8, p. 735- 739, 2013.
- BALARIN, J.D.; HALLER, R.D. The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and cages. In: Muir JF, Roberts RJ. (eds) **Recent Advances in Aquaculture**. Croom Helm, London and Canberra, and Westview Press, Boulder, Colorado. p.267–355, 1982.
- BARBOSA, M. M. C. Identificação sorológica e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de *Escherichia coli* isoladas de peixe e água de pesque-pagues. 2010.
- BARROSO, R. M. *et al.* Diagnóstico da cadeia de valor da tilapicultura no Brasil. **Embrapa Pesca e Aquicultura-Livro técnico** (INFOTECA-E), 2018.
- BHIMANI, M. *et al.* Loop-mediated Isothermal Amplification assay (LAMP) based detection of *Pasteurella multocida* in cases of haemorrhagic septicaemia and fowl cholera. **Veterinaria Italiana**. p.115-121. 2015
- BOSCOLO, W. R. *et al.* Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1391-1396, 2001.
- BRANDÃO, C. D.S. Um Enfoque Na Produção De Tilápias Nos Últimos Dez Anos. Universidade Federal Da Bahia Faculdade De Economia Curso De Graduação Em Ciências Econômicas Perspectivas Do Desenvolvimento Da Piscicultura No Brasil. 2018.
- CAIPANG, C.M.A. *et al.* Detecção de *Francisella piscicida* em bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua* L) pela reação de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP). **The Veterinary Journal**, v. 184, n. 3, pág. 357-361, 2010.
- CAMPOS, F. S. Desenvolvimento de PCR convencional e em tempo real para o Vírus da Língua Azul. 2010.
- CARREON, M. M. *et al.* *Francisella noatunensis orientalis* em Tilápias Do Nilo Cultivadas Em Tanques-Rede Na Bacia Do Rio Araguari, MG. 2018.

CHAOUCH, M. Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP): Uma técnica molecular eficaz de ponto de atendimento para o diagnóstico rápido do coronavírus SARS-CoV-2. **Revisões em virologia médica**, v. 31, n. 6, pág. e2215, 2021.

CHIARI, M. F. Nova metodologia de diagnóstico para *Ehrlichia canis*: PCR X LAMP. 2010.

COLQUHOUN, D. J.; DUODU, S. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 1–15, 8 mar. 2011. Disponível em: <<https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1297-9716-42-47>>. Acesso em: 21 jun. 2022.

CONTE, F.S. Estresse e bem-estar de peixes cultivados. **Ciência Aplicada do Comportamento Animal**, v. 86, n. 3-4, pág. 205-223, 2004.

EIKEN CHEMICAL CO., LTD. Molecular Test “LAMP”. Disponível em: <<https://www.eiken.co.jp/en/products/lamp/>>. Acesso em 30/07/2022

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Cultured Aquatic Species Information Programme. Rakocy JE. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department (online). Rome. 2005. Acesso em: 14 de junho de 2022. Disponível em <[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en)>.

GENG, Y. *et al.* *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 59, n. 4, p. 369-375, 2011.

GONÇALVES, D. Detecção da bactéria *Wolbachia* em insetos através da técnica LAMP (amplificação isotérmica mediada por loop). 2014

HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Rev Científica de Medicina Veterinária**, v. 14, n. 26, 2016.

JIMÉNEZ, A. *et al.* Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis sp.*) tissue. **Aquaculture**, v. 321, n. 3-4, p. 203–206, dez. 2011.

KAYANSAMRUJ, P. *et al.* Caracterização molecular e perfil genético de virulência de populações patogênicas de *Streptococcus agalactiae* de fazendas de tilápia (*Oreochromis sp.*) na Tailândia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 4, pág. 488-495, 2014.

KE, X. *et al.* Desenvolvimento de Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) para Detecção Rápida de *Streptococcus agalactiae* em Tilápia, *Oreochromis*

*niloticus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, n. 5, pág. 586-594, 2014.

KUBITZA, F. Antecipando-se às doenças na tilapicultura. **Panorama da aquicultura**, v. 15, n. 89, p. 15-23, 2005.

KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Ed. do Autor, 2000

KUBITZA, F. Tilápias na mira dos patógenos. **Panorama da aquicultura**, v. 18, n. 107, p. 28-37. 2008.

LEIN, A. L. C. Amplificação isotérmica mediada por loop para identificação de espécies de peixes. 2022.

LEIRA, M. H. *et al.* As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura. **Nutri Time, Viçosa**, v. 14, n. 02, p. 4982-4996, 2017.

LIVAK, K.J. *et al.* Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.*, v.4, n.6, p.357–362, 1995.

MAO, Z *et al.* Development of visual loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the bacterial pathogen *Pseudomonas putida* of the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Journal of Microbiological Methods**. Vol. 89, p. 179-184, 2012.

MARCUSSO, P. F. *et al.* Isolamento de *Streptococcus agalactiae* em diferentes órgãos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede. **Bioscience Journal**, p. 549-554, 2015.

MARCUSSO, P. F.; SALVADOR, R.; DE ALMEIDA MARINHO-NETO, F. Infecção por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 2, p. 165-169, 2017.

MARQUES DA SILVAAYROZA, L. Criação De Tilápia-Do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, Em Tanques-Rede, Na Usina Hidrelétrica De Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR. 2009.

MORAES, A. C. de. Eficácia terapêutica, segurança clínica e ecotoxicológica da amoxicilina por via intramuscular para o tratamento de estreptococose em tilápias do Nilo. 2017.

MORI, Y. *et al.* Visual detection of nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. **BioTechniques**. 2001.

- NGUYEN, H. T.; KANAI, K.; YOSHIKOSHI, K. Investigação ecológica de *Streptococcus iniae* em cultura de linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) usando procedimentos de isolamento seletivo. **Aquicultura**, v. 205, n. 1-2, pág. 7-17, 2002.
- NOTOMI, T. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 12, p. e63-e63, 2000.
- NUNES, M. *et al.* Aplicação da técnica Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) no desenvolvimento de um teste para o diagnóstico da peste. 2013.
- OLIVEIRA K. G. Amplificação isotérmica de DNA mediada por Loop LAMP) em microchip de poliéster-toner. Goiânia. **Instituto de química da Universidade Federal de Goiás**. p. 5-8. 2016
- OLIVEIRA, D. M. Padronização de técnicas moleculares para o diagnóstico e epidemiologia de leishmaniose tegumentar americana. Universidade Estadual de Maringá. 2009.
- OLIVEIRA, M. C. D. S. *et al.* Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste**. 2007.
- OSMAN, K. M. *et al.* Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as an aquatic vector for *Pseudomonas* species of medical importance: Antibiotic Resistance Association with Biofilm Formation, Quorum Sensing and Virulence. **Aquaculture**, v. 532, p. 736068, 15 fev. 2021.
- PARK, Y. K. *et al.* Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 1-2, p. 76-81, 2009.
- PEIXE BR. Anu rio Brasileiro da Piscicultura, PEIXE BR 2022. São Paulo: Associação Brasileira da Piscicultura, 2022.
- PEPEY, E. *et al.* Application of the FTA elute card coupled with visual colorimetric loop-mediated isothermal amplification for the rapid diagnosis of *Streptococcus agalactiae* in farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Fish Diseases**, v. 44, n. 5, p. 505-512, 2021.
- RAMOS, F. C. E. Estratégias profiláticas contra estreptococose mediante diferentes metodologias de inativação, adjuvantes e suplementação com Manan oligossacarídeos em tilápias-do-nilo. 2020.
- RIBEIRO, D. C. Desenvolvimento E Padronização De Um Elisa Indireto Para Diagnóstico De *Streptococcus agalactiae* Em Tilápias Do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2016.

RIBEIRO, S.A. *et al.* Loop mediated isothermal amplification assay (lamp): uma revisão detalhada sobre a técnica. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 48, n. 1, p. 8809, 2022.

ROEHRS, M. C. S. M. Detecção do *Streptococcus agalactiae* realizado no Hospital Universitário de Santa Maria. 2012.

SALVADOR, R. *et al.* A. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 1374-1378, 2005.

SCHULTER, E. P.; FILHO, J. E. R. V. Desenvolvimento E Potencial Da Tilapicultura No Brasil. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 16, n. 2, p. 177–201, 3 out. 2018. Disponível em: <<https://periodicos.ufv.br/rea/article/view/7830>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

SEBASTIÃO, F. D. A. Validação de técnicas moleculares para o diagnóstico de bactérias em peixes, visando redução de tempo e custo. 2015.~

SILVA, S. J. D. Desenvolvimento de ferramentas moleculares rápidas e de baixo custo para o diagnóstico do vírus Zika. 2019.

SUEBSING, R. *et al.* Avaliação do ensaio de amplificação isotérmica mediada por loop colorimétrico para detecção visual de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus iniae* em tilápia. **Cartas em microbiologia aplicada**, v. 57, n. 4, pág. 317-324, 2013.

TAVARES DIAS, M. A introdução da tilápia em ambientes diversos de sua origem e as consequências negativas. **Embrapa Amapá-Nota Técnica/Nota Científica (ALICE)**, 2019.

TOMITA, N. *et al.* Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) de sequências de genes e detecção visual simples de produtos. **Nat. Protocolos** 3:877–882. 2008

TORANZO, A. E.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J. L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 246, n. 1-4, p. 37-61, 2005.

WONG, Y. P. *et al.* Colorimetric Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Using pH-Sensitive Dyes. **BioMed Research International**. 2015. Doi: 10.1155/2015/489051

XIMENES, C. V. Desenvolvimento e validação de sistemas baseados em Lamp (amplificação isotérmica em alça) e PCR convencional para o diagnóstico da *Wuchereria bancrofti* em fluidos biológicos. 2017.

YI, T. *et al.* Protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and  $\alpha$ -enolase.

**Aquaculture**, v. 428-429, p. 35–40, 2014.

YOSHIKAWA, A. A. G. Desenvolvimento de um kit de diagnóstico molecular point-of-care para COVID-19. 2022.

ZATTI, M. Métodos de amplificação isotérmica e algumas aplicações. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2016.

ZHANG, X. *et al.* Breve revisão dos métodos de monitoramento para amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP). **Biossensores e Bioeletrônica**, v. 61, p. 491-499, 2014.