



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

ÁDILA HOLANDA DE OLIVEIRA

PROPOSTA DE ANÁLISE DIAGNÓSTICA DE *Vibrio* EM CAMARÃO *Penaeus vannamei* POR PCR EM TEMPO REAL

FORTALEZA

2025

ÁDILA HOLANDA DE OLIVEIRA

PROPOSTA DE ANÁLISE DIAGNÓSTICA DE *Vibrio* EM CAMARÃO *Penaeus vannamei*
POR PCR EM TEMPO REAL

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Organismos Aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.
Co-orientador: Dr. Rafael dos Santos Rocha

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O52p Oliveira, Ádila Holanda de.

Proposta de análise diagnóstica de Vibrio em camarão *Penaeus vannamei* por PCR em tempo real / Ádila Holanda de Oliveira. – 2025.

72 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

Coorientação: Prof. Dr. Rafael dos Santos Rocha.

1. Carcinicultura. 2. Diagnóstico molecular. 3. Patógeno. I. Título.

CDD 639.2

ÁDILA HOLANDA DE OLIVEIRA

PROPOSTA DE ANÁLISE DIAGNÓSTICA DE *Vibrio* EM CAMARÃO *Penaeus vannamei*
POR PCR EM TEMPO REAL

Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.
Co-orientador: Dr. Rafael dos Santos Rocha

Aprovado em 30/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Jéssica Lucinda Saldanha da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Maria Angela e Paulo Benício,
que sob muito sol, fez-me chegar até aqui, na
sombra.

A minha irmã, Isabelly Holanda e meu noivo,
Gustavo Félix.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à Universidade Federal do Ceará (UFC), instituição que foi essencial para minha trajetória acadêmica. Destaco, de modo especial, o Departamento de Engenharia de Pesca, que contribuiu de maneira significativa para minha formação técnica e profissional, sendo pilar importante durante toda minha graduação.

Agradeço especialmente à Consultoria em Recursos Aquáticos (CORAq), que me proporcionou experiências incríveis, pelos amigos que fiz e por ter me ajudado a encontrar a área com a qual verdadeiramente me conecto, a Aquicultura. Gostaria de agradecer especialmente a tutora Gleire Menezes, que foi muito além do papel de tutora. Obrigada por cada conversa, cada carona, cada gesto de cuidado e apoio.

Estendo meus agradecimentos ao Programa de Educação Tutorial (PET), por cada oportunidade, apoio financeiro, profissional, a tutora Kelma Pires e por todos os amigos que fiz nesse grupo, em especial a Leticia Andrade, Maria Eduarda, Jaziel Martins, Risette Ferreira e Rodrigo Gomes.

Ao CEDECAM, laboratório no qual tive a oportunidade de crescer e aprender, deixo minha gratidão, especialmente ao meu co-orientador Dr. Rafael dos Santos Rocha, à técnica Maria das Graças Lima Coelho, meus colegas Dérick Gomes e Dominique Marques, que estiveram ao meu lado em todas as etapas do TCC. Obrigada por cada ajuda, conversa, café e demonstração de apoio. Vocês tornaram essa jornada muito mais leve.

Também gostaria de agradecer ao meu orientador, Rodrigo Maggioni e aos membros da minha banca, Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes e Profa. Dra. Jéssica Lucinda Saldanha da Silva.

E não poderia deixar de agradecer aos meus pais, irmã e noivo, vocês foram minha base, meu alicerce, meu refúgio seguro. Vocês são o meu maior exemplo de amor e força. Obrigada por cada renúncia, cada palavra de apoio nos momentos difíceis, cada gesto de cuidado e, acima de tudo, por nunca duvidarem do meu potencial, mesmo quando eu mesma hesitei.

E, por fim, aos grandes amigos que a graduação me proporcionou e tornaram tudo mais, feliz e leve: Ingrid Alves, Pedro Roger, Paulo Henrique, Bianca Ferreira, Beatriz Costa, Dérick Gomes e Daniel Amorim. Nossa amizade é o maior presente que a universidade me deu. Levo vocês comigo para o resto da vida. A todos vocês, meu mais sincero e emocionado obrigada.

Mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fadigam. (Isaías 40:31).

RESUMO

A intensificação da carcinicultura tem contribuído para o aumento da ocorrência de enfermidades bacterianas, especialmente as causadas por bactérias do gênero *Vibrio*. Dentre essas, *Vibrio parahaemolyticus* destaca-se por ser o agente etiológico da Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND), responsável por elevadas taxas de mortalidade em *Penaeus vannamei*. Diante da necessidade de métodos diagnósticos rápidos e sensíveis, este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um protocolo de PCR em tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação de *Vibrio* sp. e *V. parahaemolyticus*. Foram selecionados *primers* com base em análises *in silico*, utilizando a ferramenta *Primer-BLAST*, e validados por meio de alinhamento de sequências no software MEGA. A análise revelou que os *primers* para *V. parahaemolyticus* apresentaram elevada especificidade, amplificando 229 sequências exclusivamente da espécie-alvo. Ensaios *in vitro* foram conduzidos com diferentes concentrações bacterianas, misturadas ao tecido de *P. vannamei*, para extração de DNA e posterior análise por qPCR. Os resultados demonstraram curvas de amplificação e *melting* consistentes, com alta reprodutibilidade e sensibilidade. A análise estatística evidenciou diferenças significativas entre os grupos, confirmando a capacidade do protocolo em quantificar variações na carga bacteriana. Dessa forma, o protocolo desenvolvido mostrou-se eficiente para o diagnóstico molecular de *Vibrio* sp. e *V. parahaemolyticus*, representando uma ferramenta promissora para o monitoramento sanitário na carcinicultura.

Palavras - chave: carcinicultura, diagnóstico molecular, patógeno.

ABSTRACT

The intensification of shrimp farming has led to a rise in bacterial diseases, particularly those caused by the *Vibrio* genus. Among them, *Vibrio parahaemolyticus* stands out as the etiological agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND), responsible for high mortality rates in *Penaeus vannamei*. Given the need for rapid and sensitive diagnostic methods, this study aimed to develop and validate a real-time PCR (qPCR) protocol for the detection and quantification of *Vibrio* sp. and *V. parahaemolyticus*. Primers were selected through *in silico* analysis using the Primer-BLAST tool and validated through sequence alignment with MEGA software. The analysis showed that the primers for *V. parahaemolyticus* exhibited high specificity, amplifying 229 sequences exclusively from the target species. *In vitro* assays were conducted with different bacterial concentrations mixed with *P. vannamei* tissue for DNA extraction and subsequent qPCR analysis. The results demonstrated consistent amplification and melting curves, with high reproducibility and sensitivity. Statistical analysis revealed significant differences between experimental groups, confirming the protocol's ability to quantify bacterial load variation. Thus, the developed protocol proved to be efficient for the molecular diagnosis of *Vibrio* sp. and *V. parahaemolyticus*, representing a promising tool for health monitoring in aquaculture.

Keywords: shrimp aquaculture, molecular diagnosis, pathogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação taxonômica do camarão <i>Penaeus vannamei</i>	20
Figura 2 - Fotomicrografia de uma secção longitudinal do hepatopâncreas de <i>Penaeus vannamei</i> infectados por <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (AHPND).....	26
Figura 3 - Fluxograma do ensaio <i>in vitro</i>	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Bactérias do gênero *Vibrio* que acometem o *Penaeus vannamei*..... 24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Códigos das amostras do experimento.....	35
Tabela 2 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados para PCR em tempo real.....	37
Tabela 3 - Características dos <i>primers</i> utilizados para detecção de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio</i> sp. por PCR.....	39
Tabela 4 - Resultados descritivos por amostra utilizados na análise de variância (ANOVA) entre diferentes diluições padrão do DNA total extraído (tecido+inóculo) de <i>Vibrio</i> sp.....	44
Tabela 5 - Resultados descritivos por amostra utilizados na análise de variância (ANOVA) entre diferentes concentrações de DNA de <i>Vibrio</i> sp por 100 mg de DNA tecidual.....	45
Tabela 6 - Resultados descritivos por amostra utilizados na análise de variância (ANOVA) entre diferentes diluições padrão do DNA total extraído (tecido+inóculo) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	47
Tabela 7 - Resultados descritivos por amostra utilizados na análise de variância (ANOVA) entre diferentes concentrações de DNA de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> por 100 mg de DNA tecidual.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico de Amplificação dos controles positivos para <i>Vibrio</i> sp.....	40
Gráfico 2 - Curva de <i>Melting</i> dos controles positivos para <i>Vibrio</i> sp.....	41
Gráfico 3 - Curva-padrão dos controles positivos para <i>Vibrio</i> sp.....	42
Gráfico 4 - Gráfico de Amplificação dos controles-positivos para <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ..	42
Gráfico 5 - Curva de <i>Melting</i> dos controles positivos para <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	43
Gráfico 6 - Curva-padrão dos controles positivos para <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	43
Gráfico 7 - Análise da variabilidade do número de cópias/g entre diferentes diluições padrão do DNA extraído (tecido+inóculo) de <i>Vibrio</i> sp.....	45
Gráfico 8 - Análise da variabilidade do número de cópias/g entre diferentes concentrações de DNA de <i>Vibrio</i> sp por 100 mg de DNA tecidual.....	46
Gráfico 9 - Análise da variabilidade do número de cópias/g entre diferentes diluições padrão do DNA extraído (tecido+inoculo) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	48
Gráfico 10 - Análise da variabilidade do número de cópias/g entre diferentes concentrações de DNA de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> por 100 mg de DNA tecidual.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHPND	Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda
Ct	Cycle Threshold
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
ROX	Referência Passiva usada em qPCR
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TCBS	Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar
Tm	Temperatura de <i>Melting</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Carcinicultura.....	19
2.2 <i>Penaeus vannamei</i>.....	20
2.3 Enfermidades bacterianas na carcinicultura.....	21
2.4 Gênero <i>Vibrio</i>.....	22
2.5 Vibrioses.....	24
2.5.1 Doença de Necrose Hepatopancreática Aguda - AHPND.....	25
2.5.2 Impacto Econômico das vibrioses.....	27
2.6 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.....	27
2.6.1 PCR em tempo real.....	29
2.6.2 PCR em Bactérias do gênero <i>Vibrio</i>.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Origem da cepa de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>.....	32
3.2 Seleção dos primers para estudo.....	32
3.3 Análise de bioinformática para validação dos primers.....	33
3.4 Ensaio <i>in vitro</i>.....	33
3.5 Extração e quantificação de DNA.....	34
3.5.1 Das Amostras.....	34
3.5.2 Das Cepas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>.....	36
3.5 PCR em tempo real.....	36
3.6 Análises estatísticas.....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Análise Bioinformática.....	38
4.1.1 Escolha de primers, PCR <i>in silico</i> e alinhamento de sequências de <i>Vibrio</i> sp.....	38
4.1.2 Escolha de primers, PCR <i>in silico</i> e alinhamento de sequências de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>.....	39
4.2 Análise das curvas de amplificação, melting e padrão dos controles positivos por PCR em tempo real.....	40
4.2.1 <i>Vibrio</i> sp.....	40
4.2.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>.....	42
4.3 Análise estatística.....	44
4.3.1 <i>Vibrio</i> sp.....	44
4.3.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>.....	46
5 DISCUSSÃO.....	50
5.1 Análise Bioinformática.....	50
5.2 Análise das curvas de amplificação, melting e padrão dos controles positivos por PCR em tempo real.....	50
5.3 Análise estatística.....	52
5.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.....	53

6 CONCLUSÃO.....	56
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
APÊNDICE A - COMANDO UTILIZADO NO SOFTWARE R PARA A ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DAS AMOSTRAS.....	58
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura, consolidou-se como o setor produtivo de alimentos que mais cresce no mundo, fornecendo proteínas essenciais e gerando fontes de renda. Em 2022, a produção aquícola global alcançou 130,9 milhões de toneladas, com valor estimado em 312,8 bilhões de dólares, representando 59% da produção total combinada da pesca e da aquicultura, onde a continental foi responsável por 62,6% da produção de organismos aquáticos, enquanto a marinha e costeira representaram 37,4% (FAO, 2024). Essa atividade é caracterizada pelo cultivo controlado de organismos aquáticos, como peixes, crustáceos, moluscos, algas e outras formas de vida aquática de relevância econômica (VIEIRA FILHO *et al.*, 2017).

Dentre suas diferentes modalidades, a carcinicultura, que se dedica à criação de crustáceos, destaca-se como um dos setores da aquicultura que mais cresce, sendo uma importante fonte de proteína animal de qualidade e contribuindo de forma significativa para a segurança alimentar mundial (FAO, 2022). Globalmente, a principal espécie de camarão cultivada é o *Penaeus vannamei* (BOONE 1931), seguindo na liderança do cultivo mundial de crustáceos, representando 6,8 milhões de 94 milhões de toneladas da produção na aquicultura em 2022. (FAO, 2024). A crescente demanda global pelo camarão-branco-do-Pacífico impulsionou o desenvolvimento da indústria deste. No entanto, a intensificação do cultivo tem enfrentado grandes desafios com doenças, especialmente bacterianas, causadas por diversas espécies de *Vibrio* (LIAN GAN *et al.*, 2022).

As bactérias do gênero *Vibrio* são Gram-negativas, com morfologia de bastonetes curtos, curvados ou em forma de vírgula, amplamente distribuídas em ambientes aquáticos, inclusive em sistemas de produção aquícola, podendo compor a microbiota natural de crustáceos saudáveis. Contudo, cepas oportunistas estão associadas à vibriose, enfermidade infecciosa que compromete a saúde dos organismos cultivados, gerando elevadas taxas de mortalidade e prejuízos econômicos na carcinicultura, o que reforça a importância de estratégias de profilaxia e prevenção (VALENTE; WAN, 2021).

A vibriose representa um desafio crescente à saúde pública global, com aumento na sua incidência relacionado às mudanças climáticas e ao aquecimento das águas, fatores que favorecem a proliferação de *Vibrio* sp. em ecossistemas aquáticos. Dentre as espécies patogênicas, destacam-se *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, reconhecidas por sua relevância clínica em infecções humanas (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018; BRUMFIELD *et al.*, 2021).

Vibrio parahaemolyticus é o patógeno responsável pela Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda - AHPND em camarões, associada a altas taxas de mortalidade e grandes prejuízos econômicos na carcinicultura. Essa patogenicidade está relacionada à presença do plasmídeo pVA1, que codifica as toxinas PirAVP e PirBVP, principais fatores de virulência. A dinâmica da AHPND pode ser influenciada por interações com outras espécies de *Vibrio*, apresentando efeitos sinérgicos ou antagônicos (TRAN *et al.*, 2020). A disseminação da doença envolve a propagação transregional de cepas e a transferência horizontal do plasmídeo, facilitadas por práticas intensivas de cultivo, o que favorece o surgimento de variantes mais virulentas (FU *et al.*, 2020). Tais evidências reforçam a importância de medidas de biossegurança para mitigar o avanço da AHPND na carcinicultura.

Formas de diagnóstico eficientes, rápidas e robustas são essenciais para a detecção de *Vibrio* em camarões. Nesse contexto, a PCR em tempo real (qPCR) destaca-se como uma ferramenta molecular altamente sensível e específica, amplamente utilizada para o diagnóstico rápido e preciso de patógenos. Essa técnica permite a detecção e quantificação de DNA bacteriano em amostras biológicas em tempo real, reduzindo significativamente o tempo necessário para o diagnóstico em comparação aos métodos tradicionais, como o cultivo microbiológico (SÁNCHEZ-CARVAJAL *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2023; TORRES - CORRAL; SANTOS, 2020). Essa agilidade é fundamental para implementar medidas de controle e manejo, mitigando perdas econômicas e promovendo a sustentabilidade da produção aquícola.

Dessa forma, o presente estudo foi delineado com o objetivo geral de Avaliar a eficiência do uso da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio* sp. no camarão *Penaeus vannamei*. Como objetivos específicos, estabeleceu-se: (1) Verificar a eficiência dos *primers* desenhados para a identificação de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio* sp; (2) Analisar se a progressão da carga bacteriana resulta em diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais e (3) Validar a aplicação da PCR em tempo real como ferramenta para a detecção e quantificação de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio* sp. em diferentes concentrações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Carcinicultura

A carcinicultura, ramo da aquicultura dedicado à criação de camarões, tem se destacado por seus benefícios econômicos e por sua contribuição à segurança alimentar global. Esse segmento apresenta crescimento expressivo, sendo o *Penaeus vannamei*, conhecido como camarão-branco-do-pacífico, a espécie mais cultivada, com cerca de 6,8 milhões de toneladas produzidas em 2022 (FAO, 2024). Essa espécie é valorizada por sua adaptabilidade a diferentes ambientes e pelo rápido crescimento em sistemas de alta densidade (BARDERA *et al.*, 2018).

A produção de camarões tem desempenhado papel relevante na oferta global de alimentos e no desenvolvimento socioeconômico, especialmente em países do Sudeste Asiático e da América Latina (PEREIRA *et al.*, 2021). Atualmente, os camarões estão entre os produtos aquícolas mais comercializados, com uma produção que ultrapassa 8 milhões de toneladas de alto valor comercial (KUMAR *et al.*, 2021). Esse crescimento é impulsionado pela crescente demanda por proteína animal, especialmente diante da projeção de que a população mundial ultrapassará 8 bilhões de pessoas até 2030 (KUMAR *et al.*, 2022).

Conforme dados do Censo Agropecuário de 2023 do IBGE, a carcinicultura no Brasil alcançou uma produção total de 127.466,349 toneladas, resultando em um valor de produção estimado em R\$ 2.626.316,00. A atividade foi desenvolvida em 2.834 unidades produtivas distribuídas pelo território nacional, com destaque para o estado do Ceará, na região Nordeste, que se consolidou como o principal produtor do país. O estado foi responsável por 72.688,51 toneladas, distribuídas em 653 unidades produtivas, sendo o município de Aracati o maior produtor em âmbito estadual.

Apesar do crescimento, o setor enfrenta desafios significativos relacionados à incidência de enfermidades, aos elevados custos de produção, com ênfase nos gastos com alimentação, à limitação na qualidade e disponibilidade de reprodutores, bem como à dificuldade de acesso a estoques isentos de patógenos, sobretudo relacionados a surtos de doenças bacterianas e virais (VALDERRAMA *et al.*, 2016). Essas enfermidades representam a principal causa de perdas na produção, com agentes como a Síndrome da Mancha Branca e a Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND) gerando impactos econômicos significativos e ameaçando a sustentabilidade das criações. (KUMAR *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2022).

2.2 *Penaeus vannamei*

A espécie de camarão *Penaeus vannamei* (Figura 1), também conhecida como camarão-branco-do-Pacífico, é um crustáceo marinho classificado taxonomicamente na ordem Decapoda, pertencente à família Penaeidae, que inclui outras espécies de importância comercial, como *Fenneropenaeus chinensis*, *Penaeus monodon* e *Marsupenaeus japonicus* (PEREZ *et al.*, 2024). Trata-se da espécie de peneídeo mais amplamente cultivada no mundo, com uma produção global superior a 3 milhões de toneladas anuais (JONES *et al.*, 2017).

Figura 1- Classificação taxonômica do camarão *Penaeus vannamei*



Reino Animalia
 Filo Arthropoda
 Subfilo Crustacea
 Superclasse Multicrustacea
 Classe Malacostraca
 Subclasse Eumalacostraca
 Superordem Eucarida
 Ordem Decapoda
 Subordem Dendrobranchiata
 Superfamília Penaeoidea
 Família Penaeidae
 Gênero *Penaeus*
 Espécie *Penaeus vannamei*

Fonte: Aquaculture Magazine, 2023.

Nativa da costa oeste do Pacífico da América Latina, entre o Peru e o México, essa espécie encontra condições ideais em águas com temperaturas superiores a 20 °C ao longo de todo o ano (LIAO; CHIEN, 2011). Atualmente, *P. vannamei* é a espécie dominante na carcinicultura mundial, respondendo por cerca de 80% da produção global, o que representa o cultivo anual de aproximadamente 383 a 977 bilhões de indivíduos (ALBALAT *et al.*, 2022; PEDRAZZANI *et al.*, 2024).

Essa espécie apresenta características zootécnicas superiores quando comparada a outros peneídeos, como *Penaeus monodon* (ASMILD *et al.*, 2023). Entre essas vantagens

destacam-se: maior disponibilidade de reprodutores domesticados livres de patógenos virais e com seleção genética avançada, elevada taxa de sobrevivência larval, rápido crescimento, maior tolerância a altas densidades de estocagem, menor exigência proteica na dieta e elevada adaptabilidade a ambientes de baixa salinidade (LIAO; CHIEN, 2011).

O genoma de *P. vannamei* já foi sequenciado, o que representa um marco significativo para a pesquisa genética, a reprodução seletiva e a melhoria de características produtivas na aquicultura (PENG *et al.*, 2023). Esses dados genômicos possibilitaram o desenvolvimento de ferramentas moleculares, como marcadores SNP e mapas genéticos, essenciais para a identificação de regiões associadas a traços de interesse e para estudos de genômica comparativa (DU *et al.*, 2010; JONES *et al.*, 2017). Tais avanços têm contribuído diretamente para o aprimoramento do desempenho zootécnico e da resistência a doenças, favorecendo o sucesso contínuo da espécie na aquicultura global.

2.3 Enfermidades bacterianas na carcinicultura

Doenças bacterianas representam um dos principais desafios sanitários da carcinicultura, provocando perdas econômicas expressivas e ameaçando a sustentabilidade da produção aquícola e a segurança alimentar global. Dentre essas enfermidades, as causadas por espécies do gênero *Vibrio* se destacam pela ubiquidade dessas bactérias em ambientes aquáticos e por sua capacidade de provocar diversas formas de vibriose em crustáceos cultivados (VALENTE; WAN, 2021). Essas infecções podem resultar em surtos com altas taxas de mortalidade entre camarões, caranguejos e lagostas em cultivo intensivo. A Organização Mundial para a Saúde Animal (WOAH) reconhece duas doenças bacterianas de notificação obrigatória: a hepatopancreatite necrosante (NHP) e a necrose hepatopancreática aguda (AHPND).

A NHP é uma enfermidade grave que acomete principalmente o camarão *Penaeus vannamei*, causando mortalidades que podem variar de 20% a 95% (LOY *et al.*, 1996). Seu agente etiológico é uma bactéria Gram-negativa, pleomórfica e intracelular, denominada *Candidatus Hepatobacter penaei* (FREILER *et al.*, 1992; NUNAN *et al.*, 2012). Essa bactéria apresenta semelhança morfológica com o gênero *Rickettsia* e foi posicionada filogeneticamente, por meio de técnicas moleculares, como pertencente à subclasse das *Proteobacteria*, com estreita relação a endossimbiontes bacterianos de protozoários (LOY *et al.*, 1996).

A AHPND, por sua vez, é causada principalmente por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que adquiriram um plasmídeo codificador das toxinas binárias *PirA* e *PirB* (LEE *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2019). Essas toxinas têm como alvo as células do hepatopâncreas, provocando necrose aguda e morte rápida dos camarões infectados (WANG *et al.*, 2020). Apesar de *V. parahaemolyticus* ser o principal agente associado, há registros de casos ocasionais da doença causados por outras espécies do gênero *Vibrio* (DONG *et al.*, 2017).

O aumento da incidência de doenças bacterianas oportunistas e de etiologia sindrômica tem resultado no uso intensivo de antibióticos e em elevadas taxas de mortalidade nas fazendas de cultivo (SAMSING; BARNES, 2024). Além disso, fatores ambientais como mudanças climáticas, eutrofização costeira e poluição contribuem para o comprometimento da integridade epitelial dos camarões, aumentando sua suscetibilidade a infecções bacterianas.

Frente a esse cenário, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas com foco na prevenção e no controle das doenças bacterianas. Entre elas, destacam-se os planos de gestão sanitária, o uso de medidas profiláticas, terapias alternativas e o reforço da imunidade dos animais por meio da nutrição (VALENTE; WAN, 2021). Adicionalmente, o uso de probióticos, prebióticos, simbióticos, água verde, sistemas de bioflocos, bacteriófagos e imunomoduladores naturais tem mostrado potencial na prevenção de surtos. Pesquisas recentes também identificaram cepas bacterianas com propriedades probióticas que exibem forte atividade inibitória contra patógenos, oferecendo alternativas promissoras ao uso de antibióticos convencionais (ALI *et al.*, 2022).

2.4 Gênero *Vibrio*

O gênero *Vibrio* pertence ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria e família Vibrionaceae, a qual passou por uma significativa expansão e revisão taxonômica nos últimos anos (JIANG *et al.*, 2021). Até 2025, a Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) reconhece oficialmente 174 espécies do gênero *Vibrio*, validadas segundo o Código Internacional de Nomenclatura de Procariontes. Esse número evidencia o avanço acelerado no conhecimento da diversidade taxonômica do gênero *Vibrio*.

A classificação e identificação das espécies da família Vibrionaceae são realizadas com base em sequências de nucleotídeos de oito genes de manutenção (8-HKGs), obtidas a

partir de genomas completos. Essa abordagem filogenética revelou a existência de 51 clados distintos, dos quais 21 foram descritos (JIANG *et al.*, 2021).

Vibrios são bactérias halofílicas Gram-negativas autóctones de águas estuarinas e marinhas. Surtos de enfermidades causadas por esses patógenos ocorrem quando condições ambientais favorecem a rápida reprodução dessas bactérias que já estão presentes em baixas concentrações no ambiente e na microbiota do *Penaeus vannamei* (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2018; LEE E RAGHUNATH, 2018). Além disso, a versatilidade metabólica e resistência a fatores de estresse se deve, na maioria, à plasticidade genômica, facilitada pela transferência horizontal de genes e altas taxas de mutação (JOHNSON, 2013).

As bactérias do gênero *Vibrio* são Gram-negativas e apresentam morfologia de bastonetes curtos, geralmente curvados ou em forma de vírgula. Estão amplamente distribuídas em ambientes aquáticos, incluindo sistemas de produção aquícola, e podem ser isoladas da microbiota natural de crustáceos saudáveis. No entanto, diversas cepas oportunistas estão associadas a diferentes formas de vibriose, enfermidades infecciosas que comprometem a saúde de organismos cultivados. Espécies patogênicas de *Vibrio* podem causar elevadas taxas de mortalidade e prejuízos econômicos expressivos na carcinicultura, o que torna indispensáveis as estratégias de profilaxia e prevenção para o controle dessas doenças (VALENTE; WAN, 2021).

Estudos identificaram uma grande diversidade de espécies do gênero *Vibrio* em ecossistemas aquáticos variados, incluindo águas recreativas e produtos de origem marinha. Na Baía de Guanabara, Brasil, foram isoladas 20 espécies de *Vibrio*, incluindo várias com potencial patogênico (CANELLAS *et al.*, 2021). De forma semelhante, uma investigação no Reino Unido identificou ampla diversidade dessas bactérias em camarões comercializados no varejo, com destaque para *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus* como espécies de maior preocupação (JANECKO *et al.*, 2021). No México, foram detectadas *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em amostras de pescado (ÁLVAREZ-CONTRERAS *et al.*, 2021).

Embora muitas espécies de *Vibrio* estejam tradicionalmente associadas a ambientes marinhos, estudos demonstram sua presença também em águas doces. Na África do Sul, foram identificadas *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus* e *V. vulnificus* em amostras provenientes de torneiras, poços artesianos e represas (MAJE *et al.*, 2020). Esses achados reforçam a notável adaptabilidade do gênero *Vibrio* a diferentes ambientes aquáticos.

2.5 Vibrioses

As vibrioses (Quadro 1) são infecções causadas por bactérias do gênero *Vibrio*, amplamente prevalentes em sistemas de carcinicultura. Os impactos mais significativos dessas enfermidades são observados em camarões peneídeos cultivados, especialmente na forma luminescente, que pode levar a taxas de mortalidade de até 100% durante os estágios iniciais de *mysis* e pós-larvas (KUMAR *et al.*, 2021). Entre as principais espécies patogênicas destacam-se *Vibrio parahaemolyticus*, agente etiológico da Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND), e *Vibrio harveyi* (MA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2022). A AHPND, anteriormente denominada Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS), apresenta elevada gravidade e acomete principalmente as espécies *Penaeus vannamei* e *Penaeus monodon* (LI *et al.*, 2022).

Quadro 1 - Espécies de *Vibrio* associadas a infecções em *Penaeus vannamei* e suas rotas de infecção

Bactéria	Hospedeiro	Doença	Local de infecção	País	Referência
<i>V. alginolyticus</i>	<i>P. vannamei</i>	Vibriose	Músculo	Taiwan	LIU <i>et al.</i> , 2004
<i>V. campbellii</i>	<i>P. vannamei</i>	-	Órgão linfoide; coração; hemolinfa; brânquias; hepatopâncreas	-	BURGENS <i>et al.</i> , 2005
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>P. vannamei</i>	-	Brânquias; hepatopâncreas	-	AGUIRRE-GUZMÁN <i>et al.</i> , 2010
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>P. vannamei</i>	AHPND	Hemolinfa	Índia	KUMAR <i>et al.</i> , 2014
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>P. vannamei</i>	Vibriose	Camarão	Tailândia	YINGKAJORN <i>et al.</i> , 2014
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>P. vannamei</i>	AHPND	Hepatopâncreas	México	SOTO-RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 2015

Fonte: Adaptado de Rebouças, 2017.

Os sinais clínicos associados à infecção por bactérias do gênero *Vibrio* incluem hepatopâncreas pálido, fraqueza do telson, coloração escura e avermelhada da região bucal, além de manchas vermelhas na carapaça, periópodes, pleópodos e telson (SARJITO *et al.*, 2018). O *Vibrio harveyi* está particularmente relacionado à vibriose luminosa, na qual os animais afetados emitem brilho no escuro. Outra condição patológica, denominada *Bolitas negricans*, caracteriza-se pelo acúmulo de esferas de tecido descamado no trato digestivo (AUSTIN; ZHANG, 2006; ZHANG *et al.*, 2020).

Os mecanismos de patogenicidade das espécies de *Vibrio* variam entre peixes e camarões. Nos camarões, destaca-se a ação de lipopolissacarídeos endotóxicos e proteases extracelulares; já nos peixes, o principal fator de virulência é a hemolisina extracelular (ZHANG *et al.*, 2020). Além disso, fatores ambientais como pH alcalino, alta salinidade e níveis elevados de amônia favorecem a proliferação dessas bactérias (HEENATIGALA; FERNANDO, 2016). O uso de antibióticos, por sua vez, tem demonstrado eficácia limitada,

principalmente devido ao surgimento de cepas multirresistentes (HAIFA-HARYANI *et al.*, 2022; HEENATIGALA; FERNANDO, 2016).

Diversas estratégias estão sendo investigadas para o controle e prevenção das vibrioses. Entre elas, destaca-se o desenvolvimento de linhagens de camarões geneticamente tolerantes à AHPND (MAI *et al.*, 2021), a suplementação dietética com óleos essenciais (HOA *et al.*, 2023) e frutooligossacarídeos (BARRIOS *et al.*, 2023). Adicionalmente, estudos metabolômicos têm contribuído para a compreensão das alterações metabólicas provocadas pela infecção em diferentes tecidos dos camarões (MA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2022). A análise integrada do microbioma e do perfil metabólico dos animais durante os episódios de infecção representa uma abordagem promissora para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de prevenção e tratamento (REYES *et al.*, 2022).

2.5.1 Doença de Necrose Hepatopancreática Aguda - AHPND

A Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND), anteriormente conhecida como síndrome da mortalidade precoce (EMS), é causada por cepas de *Vibrio parahaemolyticus* portadoras dos genes da toxina *PirAB*, provoca perdas econômicas significativas na aquicultura, afetando especialmente o cultivo do camarão-branco-do-Pacífico (*Penaeus vannamei*) (WANG *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2023; MAI *et al.*, 2021; REYES *et al.*, 2022).

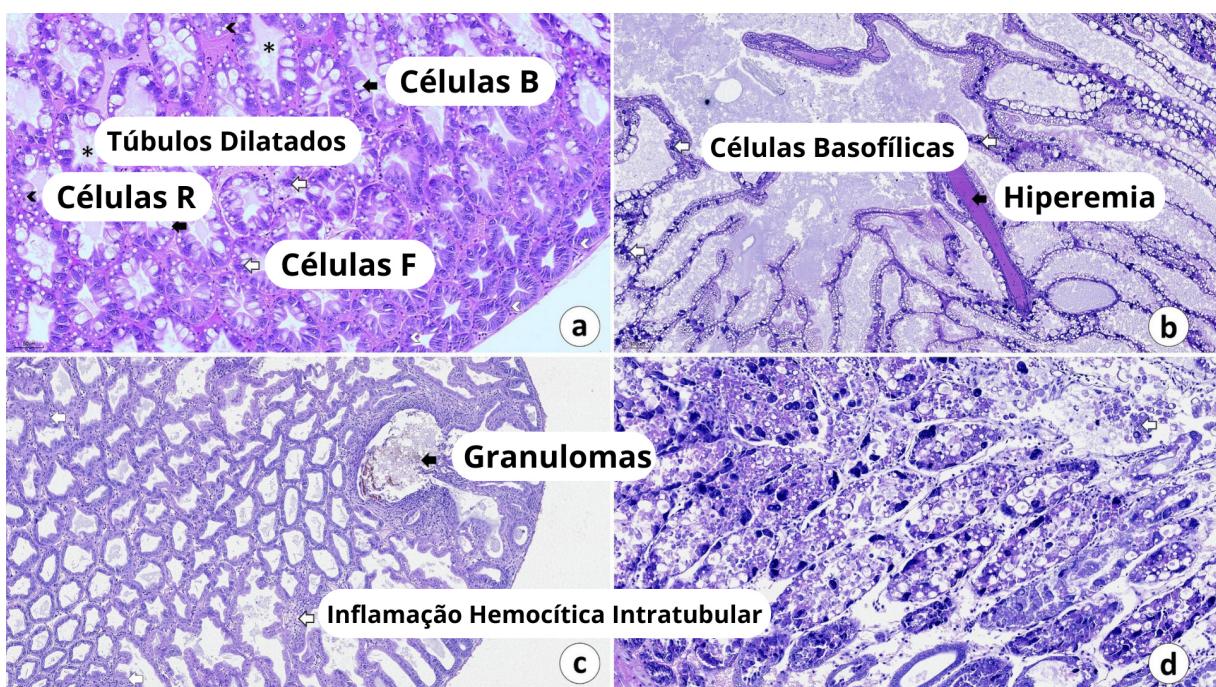
Essa enfermidade afeta severamente larvas e pós-larvas, podendo levar à mortalidade de 40 a 100% nos camarões, geralmente ocorrendo nos primeiros 30 dias após o povoamento dos viveiros (PEÑA *et al.*, 2015), com impacto direto sobre a produtividade e a lucratividade das fazendas aquícolas. Os sintomas clínicos podem ser observados em populações afetadas, incluem danos rápidos e graves ao hepatopâncreas (SANTOS *et al.*, 2019), sinais de letargia, alimentação reduzida e coloração pálida do hepatopâncreas e o exame histopatológico geralmente revela descamação de células indiferenciadas no epitélio do túbulo hepatopancreático (PEÑA *et al.*, 2015).

Camarões infectados pela AHPND apresentam diversos sinais clínicos característicos, tais como letargia, carapaça amolecida, musculatura esbranquiçada, estômago e intestino médio vazios, crescimento retardado e hepatopâncreas pálido e atrofiado, frequentemente com presença de estrias escuras (CHU *et al.*, 2016). O manejo da enfermidade é agravado pela ocorrência de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, o que reduz a

eficácia dos tratamentos convencionais e reforça a necessidade de estratégias alternativas de controle (PRAJA, 2018; SIDDIQUE *et al.*, 2021).

De acordo com Soler *et al.* (2025), a progressão da AHPND pode ser observada histologicamente em diferentes estágios da infecção no hepatopâncreas dos camarões. Em animais não infectados, no estágio inicial da infecção, são evidentes sinais de hiperemia e o acúmulo de células basofílicas. À medida que a infecção progride, o tecido apresenta formação de granulomas e inflamação hemocítica intratubular. Na fase aguda, observa-se necrose quase total do tecido pancreático, descamação epitelial e áreas multifocais de melanização, essas fases podem ser observadas na figura 2.

Figura 2 - Fotomicrografia de uma secção longitudinal do hepatopâncreas de *Penaeus vannamei* infectados por *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND). Legenda: (a) Amostra controle. (b) Estágio inicial da infecção. (c) Estágio avançado da AHPND. (d) Fase aguda da infecção. Barras de escala: (a) 50 µm, (b) 100 µm, (c) 100 µm, (d) 60 µm.



Fonte: Adaptado de Soler *et al.*, 2025

Diante da gravidade do problema, pesquisadores têm explorado diversas estratégias de mitigação, incluindo a utilização de probióticos (AMIIN *et al.*, 2023; THOMPSON *et al.*, 2022) e compostos naturais, como extrato de moringa, que demonstraram potencial imunomodulador e capacidade de aumentar a resistência dos camarões às infecções por *Vibrio* (ABIDIN *et al.*, 2021). Essas abordagens buscam promover o aumento das taxas de

sobrevivência e da produtividade, contribuindo para a redução dos prejuízos associados à AHPND na carcinicultura. Adicionalmente, avanços na área de diagnóstico vêm permitindo a detecção precoce da doença. Um exemplo é o desenvolvimento do ensaio RPA-CRISPR/Cas12a, que possibilita a identificação rápida e específica dos genes de virulência associados ao AHPND (LI *et al.*, 2022).

2.5.2 Impacto Econômico das vibrioses

Surtos de vibriose representam um ônus econômico significativo para a carcinicultura em todo o mundo, espécies como *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* e *V. alginolyticus*, são os principais patógenos que afetam camarões e outros crustáceos na aquicultura, causando alta mortalidade e graves perdas econômicas em todo o mundo (S *et al.*, 2021; VALENTE; WAN, 2021).

O impacto econômico se estende além das perdas diretas na produção de camarão. Um estudo sobre infecção por *Vibrio alginolyticus* em caranguejos de lama (*Scylla serrata*) relatou até 70% de mortalidade durante surtos de verão em fazendas de aquicultura de Hong Kong (KWOK *et al.*, 2024) . Isso destaca que a vibriose pode afetar significativamente diversas espécies de crustáceos na aquicultura, não apenas o camarão.

Espera-se que o ônus econômico da vibriose na aquicultura aumente devido às mudanças climáticas. Projeções indicam que, até 2090, o aumento da temperatura da superfície do mar poderá levar a um aumento de 51% a 108% nos casos de vibriose anualmente, somente nos Estados Unidos, com custos associados que podem chegar a bilhões de dólares (SHEAHAN *et al.*, 2022) . Embora este estudo tenha se concentrado em casos humanos, ele ressalta a crescente ameaça da vibriose à saúde pública e à economia da aquicultura, à medida que as condições ambientais se tornam mais favoráveis ao crescimento do *Vibrio*.

2.6 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Kary Mullis em 1983, consiste em uma técnica *in vitro* de amplificação de DNA fundamental para a biologia molecular e o diagnóstico clínico (SCHOCHELMAN *et al.*, 1988). Sua capacidade de detectar e amplificar sequências específicas de DNA com alta sensibilidade e especificidade a

torna uma ferramenta indispensável em diversas aplicações, desde a pesquisa básica até o monitoramento de doenças infecciosas (OLIVE, 1989; ZAZZI *et al.*, 1993).

Esse método consiste numa série de ciclos que se repetem sucessivamente: desnaturação, anelamento e extensão. Na primeira etapa, denominada desnaturação, o DNA molde é aquecido a cerca de 95 °C, promovendo a separação das fitas da dupla-hélice, o que permite a exposição das sequências-alvo para a ligação dos *primers* (GAVRILOV *et al.*, 2022; JIE *et al.*, 2020). Em seguida, ocorre o anelamento, no qual a temperatura é reduzida, geralmente para a faixa de 50 °C a 65 °C, possibilitando que os *primers* se liguem de forma específica às suas sequências complementares nas fitas simples de DNA. A temperatura exata dessa etapa varia conforme as características dos *primers* utilizados (JIE *et al.*, 2020; SREEJITH *et al.*, 2019). Por fim, na etapa de extensão, a temperatura é ajustada para aproximadamente 72 °C, condição ideal para a atuação da DNA polimerase, que estende os *primers* sintetizando novas fitas complementares, resultando na formação de moléculas de DNA de fita dupla recém-amplificadas (GAVRILOV *et al.*, 2022; JIE *et al.*, 2020).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode ser aplicada tanto a moldes de DNA quanto de RNA, embora existam diferenças fundamentais entre os dois processos. A PCR utilizada para amplificação de um desoxirribonucleotídeo, emprega diretamente a ação de uma polimerase termoestável para sintetizar cópias da sequência-alvo. Por outro lado, a amplificação de ribonucleotídeos exige uma etapa adicional: a conversão prévia em DNA complementar (cDNA) mediada pela transcriptase reversa, uma vez que o processo subsequente depende exclusivamente da duplicação de fitas de DNA e caracteriza a técnica conhecida como PCR com transcrição reversa - RT-PCR (BRIDGE, 2016). A RT-PCR é amplamente utilizada para detectar e quantificar alvos de RNA, como em estudos de expressão gênica e no diagnóstico de infecções virais, e consiste em duas etapas principais: a síntese de cDNA a partir do RNA molde, seguida pela amplificação desse cDNA via PCR (NAVECA *et al.*, 2017; TSUGANE; SUZUKI, 2018).

As técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) tornaram-se ferramentas essenciais para a detecção e identificação de bactérias em diversas aplicações. Esses métodos destacam-se por sua rapidez, sensibilidade e especificidade, superando as abordagens tradicionais baseadas em cultivo (CHEN *et al.*, 2022; KAKIZAKI *et al.*, 2023). Ensaios de PCR multiplex, por exemplo, permitem a detecção simultânea de múltiplos patógenos bacterianos, aumentando significativamente a eficiência em testes diagnósticos e de segurança alimentar (KAKIZAKI *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2022). Ademais, métodos baseados em PCR são

capazes de distinguir entre bactérias viáveis e não viáveis, superando uma das principais limitações das técnicas convencionais de detecção baseadas em DNA (CHEN *et al.*, 2022).

2.6.1 PCR em tempo real

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) é uma variação avançada da técnica de PCR convencional que permite o monitoramento do progresso da amplificação do DNA ao longo dos ciclos de reação. Trata-se de uma metodologia molecular amplamente utilizada, destacando-se por sua capacidade de quantificação, elevada sensibilidade, especificidade e rapidez (ARTIKA *et al.*, 2022).

A qPCR utiliza sistemas de detecção baseados em fluorescência para acompanhar a amplificação do DNA alvo durante os ciclos de temperatura. Isso pode ser realizado por meio de sondas fluorescentes específicas, como as do tipo *TaqMan*, ou por corantes intercalantes não específicos, como o *SYBR Green*, que se ligam ao DNA fita dupla. Essa abordagem permite não apenas a detecção, mas também a quantificação precisa de ácidos nucleicos, incluindo DNA e RNA, presentes nas amostras analisadas (ZHANG *et al.*, 2021).

A escolha criteriosa de *primers* é um dos principais fatores que determinam o sucesso e a especificidade das reações de PCR em tempo real. Segundo Chen *et al.* (2023), os *primers* ideais devem possuir temperatura de *Melting* (Tm) próxima de 60 °C, e o amplicon resultante deve ter comprimento preferencial entre 75 a 150 pares de bases (podendo chegar até 250 pb, dependendo da aplicação), com regiões de anelamento preferencialmente flanqueando ítrons, a fim de evitar amplificação de DNA genômico em análises de expressão gênica.

Singh e Pandey (2015) complementam que, para garantir quantificação precisa, a Tm entre 58 °C e 65 °C, e não devem formar estruturas secundárias ou dímeros de *primers*. Além disso, recomenda-se que os Tm dos *primers* F (*Forward primer*) e R (*Reverse primer*) sejam similares para manter a eficiência de amplificação (MITSUHASHI, 1996). De acordo com Rodríguez *et al.* (2015), é essencial observar critérios como a relação entre guanina (G) e citosina (C) é importante na PCR porque afeta a estabilidade dos *primers*. Um conteúdo de GC muito alto (>60%) pode dificultar a desnaturação do DNA e favorecer a formação de estruturas secundárias, enquanto um conteúdo baixo (<40%) pode levar a ligações instáveis e inespecíficas. Por isso, recomenda-se que os *primers* tenham entre 40% e 60% de GC, minimizando a formação de dímeros de *primers*. Esses parâmetros são fundamentais para

assegurar a especificidade, sensibilidade e eficiência da PCR em tempo real, contribuindo para a confiabilidade dos dados obtidos.

Por ser um método altamente sensível, rápido e versátil, a PCR em tempo real desempenha um papel fundamental em diversas aplicações, como a análise de expressão gênica, detecção de mutações, quantificação de patógenos e diagnóstico molecular de doenças (AN et al., 2020; ARTIKA et al., 2022). Sua capacidade de fornecer resultados precisos em tempo reduzido consolida sua relevância tanto na pesquisa científica quanto no diagnóstico clínico.

2.6.2 PCR em Bactérias do gênero *Vibrio*

As técnicas baseadas em PCR tornaram-se ferramentas indispensáveis para a detecção rápida, sensível e precisa de espécies patogênicas do gênero *Vibrio*, sobretudo, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus* (BONNY et al., 2020). Esses métodos oferecem vantagens significativas sobre as abordagens tradicionais dependentes de cultura, destacando-se pela maior confiabilidade, consistência e agilidade nos resultados.

Diversos protocolos moleculares foram desenvolvidos e aprimorados para a detecção de *Vibrio*, cada um com características específicas que otimizam sua aplicação. De acordo com Saetang et al. (2023), a PCR multiplex combinada com ensaio de vareta de fluxo lateral (LFD) demonstrou alta sensibilidade e especificidade para *V. parahaemolyticus* patogênico, sendo capaz de detectar até 10 unidades formadoras de colônia (UFC) por 10 g de amostra de camarão após apenas 4 horas de enriquecimento. De forma semelhante, a amplificação por recombinase (RPA) associada a tiras de fluxo lateral (LFS) apresentou excelente desempenho, detectando até 1 UFC por reação sem a necessidade de purificação do DNA, ou 10 UFC/10 g em alimentos após apenas 2 horas de enriquecimento (YANG et al., 2020).

No contexto da Doença de Necrose Hepatopancreática Aguda - AHPND, causada por cepas específicas de *V. parahaemolyticus*, métodos de PCR direcionados aos genes das toxinas pirA e pirB se mostraram eficazes na detecção do patógeno (HOSSAIN et al., 2020; LI et al., 2022). Especificamente, técnicas baseadas em PCR com marcadores genéticos demonstraram alta especificidade na identificação do agente em *Penaeus monodon* infectado por AHPND, sendo também aplicáveis ao *P. vannamei* (HOSSAIN et al., 2020).

Os métodos baseados em PCR revolucionaram a detecção de espécies de *Vibrio*, oferecendo alternativas rápidas, precisas e convenientes às técnicas tradicionais. Esses

métodos são particularmente relevantes para detecção no local em condições de recursos limitados, tornando-os ferramentas cruciais para gestão de segurança alimentar, maricultura e vigilância em saúde pública (PARK; ZHANG, 2024; YANG *et al.*, 2020). Considerando que as mudanças climáticas aumentam potencialmente a prevalência de infecções por *Vibrio* em regiões temperadas, a relevância e a demanda por essas tecnologias diagnósticas tendem a crescer significativamente nos próximos anos (FORD *et al.*, 2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem da cepa de *Vibrio parahaemolyticus*

A cepa de *Vibrio parahaemolyticus* utilizada neste estudo foi obtida da coleção microbiológica de Regine Vieira, no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP), vinculado ao Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR/UFC). Essa cepa foi previamente isolada de um ambiente de carcinicultura e apresenta diversos fatores de virulência, sendo, portanto, potencialmente patogênica. As cepas foram empregadas nos ensaios voltados à detecção de *V. parahaemolyticus*, bem como à detecção de *Vibrio* sp., com o objetivo de validar a metodologia proposta em nível de gênero.

As cepas, inicialmente, foram crescidas em meio de caldo de soja tríptica acrescido de 1% (p/v) de NaCl (TSB 1%) e incubadas a 35 °C por 24 h. Após, as cepas foram repicadas em ágar de soja tríptica acrescido de 1% (p/v) de NaCl (TSA 1%) e a pureza verificada através da coloração morfotintorial de Gram. Por fim, as cepas foram crescidas em ágar Tiosulfato Citrato Bile e Sacarose (Ágar TCBS) para verificação de aspectos morfocoloniais e resposta a fermentação da sacarose.

A sequência de DNA da bactéria utilizada no estudo foi devidamente registrada no repositório genômico *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), assegurando sua rastreabilidade e disponibilidade pública. O processo de submissão foi realizado sob o código de identificação SUB14941907, sendo atribuído o número de acesso PQ783156 para a sequência de *Vibrio parahaemolyticus*, contribuindo para a validação experimental da metodologia proposta.

3.2 Seleção dos primers para estudo

Foi realizada uma revisão bibliográfica criteriosa na literatura, com o intuito de identificar *primers* previamente descritos para a detecção molecular de *Vibrio parahaemolyticus* e, de forma mais ampla, do gênero *Vibrio*. A busca foi conduzida por meio de plataformas científicas, como *Science Direct*, *Google Acadêmico* e o portal Periódicos CAPES, com foco em artigos revisados por pares, protocolos validados e estudos recentes que abordassem o desenvolvimento ou a aplicação de oligonucleotídeos específicos para esses microrganismos.

Durante essa etapa, foram coletadas informações detalhadas sobre os *primers* utilizados em diferentes contextos diagnósticos, levando em consideração características

como a região-alvo do genoma, o tamanho esperado do amplicon, a sensibilidade do método, a especificidade entre espécies do gênero *Vibrio* e a frequência de uso em estudos semelhantes. Além disso, foi considerado que os *primers* seriam aplicados em qPCR, uma técnica que impõe restrições quanto à quantidade de oligonucleotídeos utilizados.

3.3 Análise de bioinformática para validação dos primers

As sequências genéticas alvo para o diagnóstico de *Vibrio* foram obtidas a partir do banco de dados genômico público *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), no qual, contém uma vasto acervo de sequências genéticas já depositadas para diferentes espécies de *Vibrio*.

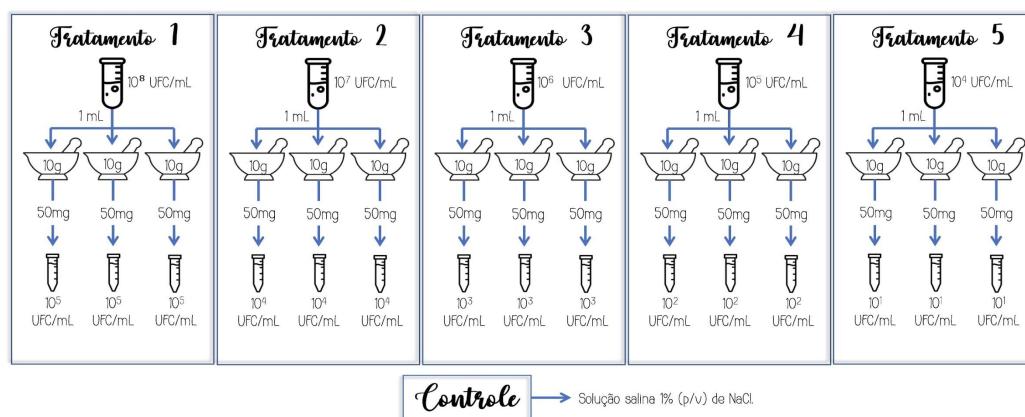
A avaliação da especificidade dos *primers* e das sondas foi realizada por meio de análise *in silico* utilizando a ferramenta *Primer-BLAST* (NCBI), com o intuito de assegurar a ausência de amplificação cruzada com outras espécies bacterianas. Essa ferramenta permitiu simular o anelamento dos *primers* frente ao conjunto de sequências previamente selecionadas, encontradas no *GenBank*, possibilitando a validação teórica das regiões-alvo por meio de PCR *in silico*. Além disso, as sequências genéticas obtidas na triagem foram exportadas em formato FASTA e alinhadas manualmente utilizando o *Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA).

3.4 Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro* (Figura 3) foram realizados a partir da mistura dos inóculos de *Vibrio* (em concentrações pré-estabelecidas) com músculo de amostras do camarão *Penaeus vannamei*, livres de infecções prévias, a partir de um sistema de cultivo controlado. O tecido muscular foi escolhido em detrimento de outros órgãos por ser considerado inócuo, além de apresentar composição uniforme, facilitar o manuseio laboratorial e permitir resultados mais confiáveis nos ensaios de detecção. Para isso, o inóculo bacteriano foi padronizado para 10^8 UFC/mL e diluído, seriadamente, até 10^4 UFC/mL, resultando em 5 tratamentos com concentrações de inóculo distintas. Após, 1 mL de cada inóculo foi adicionado em 10 g de músculo, misturado, em triplicata para cada tratamento. Um tratamento controle foi considerado, utilizando-se solução salina 1% (p/v) de NaCl. Posteriormente, de cada repetição/tratamento, foram retirados 50 mg, dos quais foi extraído o DNA, utilizando-se o

protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Os cinco tratamentos com inóculo resultaram em concentrações finais de 5×10^5 UFC/g até 5×10^1 UFC/g. Após a extração, foi realizada PCR em tempo real para a *V. parahaemolyticus* e *Vibrio* sp, utilizando-se o reagente SYBR Green.

Figura 3 - Fluxograma do ensaio *in vitro*



Fonte: A autora, 2025.

3.5 Extração e quantificação de DNA

3.5.1 Das Amostras

O DNA total foi extraído a partir de amostras de tecido muscular do camarão *Penaeus vannamei*, utilizando o protocolo clássico de digestão com Proteinase K seguido por extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989), com adaptações. Inicialmente, microtubos e ponteiras foram expostos à radiação UV por 15 minutos para garantir a esterilidade do material. De cada tratamento, foram retirados 150 mg de tecido muscular, os quais foram divididos em três microtubos estéreis contendo 50 mg cada.

As amostras foram lavadas com tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) por 5 minutos. Após a remoção do excesso de tampão com auxílio de ponteiras estéreis, o tecido foi macerado e transferido para microtubos contendo 700 µL de tampão de extração e 20 µL de Proteinase K (20 µg/mL). A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada em banho-maria a 56 °C por 15 horas, para promover a digestão do tecido e liberação do material genético. Em seguida, foram adicionados 350 µL de fenol e 350 µL da solução 24:1 de clorofórmio:álcool isoamílico. A mistura foi agitada por inversão durante 5 minutos e

centrifugada a 7.000 x g por 5 minutos. A fase aquosa (superior) foi coletada e transferida para um novo microtubo estéril, evitando a contaminação com a fase orgânica inferior. Posteriormente, foram adicionados 650 µL da solução 24:1 de clorofórmio:álcool isoamílico à fase aquosa, repetindo-se o processo de inversão e centrifugação. Após essa etapa, 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo, procedendo-se à precipitação do DNA com a adição de 1 mL de etanol absoluto (2 da fase aquosa) e 50 µL de acetato de sódio 3M (0,1 da fase aquosa). A mistura foi incubada em freezer por 15 minutos. O DNA precipitado foi recuperado por centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos, seguida do descarte do sobrenadante.

O pellet obtido foi lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v) gelado e centrifugado novamente a 10.000 x g por 5 minutos. O etanol residual foi removido e foram colocados invertidos sobre papel absorvente por 30 minutos para secagem parcial. Em seguida, os tubos foram incubados em hot-block a 70 °C por 10 minutos para completar a secagem do DNA. Por fim, o DNA foi ressuspenso em 50 µL de tampão de eluição e armazenado sob refrigeração até sua utilização nas análises moleculares. Ao final da extração, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria, utilizando o equipamento NanoDrop®, para determinar a concentração e a pureza do DNA. Cada amostra, após a etapa de quantificação, recebeu um código específico, utilizado como referência para sua identificação e organização, conforme apresentado no Tabela 1.

Tabela 1 - Códigos das amostras do experimento

Código	Descrição
C	Controle
IVP1	100 ng DNA Tecido + 1 ng de DNA <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
IVP2	100 ng DNA Tecido + 5 ng de DNA <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
IVP3	100 ng DNA Tecido + 10 ng de DNA <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
IVP4	100 ng DNA Tecido + 20 ng de DNA <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
IVP5	100 ng DNA Tecido + 25 ng de DNA <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
IV1	100 ng DNA Tecido + 1 ng de DNA <i>Vibrio sp</i>
IV2	100 ng DNA Tecido + 5 ng de DNA <i>Vibrio sp</i>
IV3	100 ng DNA Tecido + 10 ng de DNA <i>Vibrio sp</i>
IV4	100 ng DNA Tecido + 20 ng de DNA <i>Vibrio sp</i>
IV5	100 ng DNA Tecido + 25 ng de DNA <i>Vibrio sp</i>
VP1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> - 10 ⁴
VP2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> - 10 ⁵
VP3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> - 10 ⁶
VP4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> - 10 ⁷
VP5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> - 10 ⁸
V1	<i>Vibrio sp</i> - 10 ⁴
V2	<i>Vibrio sp</i> - 10 ⁵
V3	<i>Vibrio sp</i> - 10 ⁶
V4	<i>Vibrio sp</i> - 10 ⁷
V5	<i>Vibrio sp</i> - 10 ⁸

Fonte: A autora, 2025.

3.5.2 Das Cepas de *Vibrio parahaemolyticus*

A fim de possibilitar a detecção molecular de *Vibrio parahaemolyticus* por PCR em tempo real, bem como a construção da curva padrão para quantificação absoluta, foi realizada a extração e quantificação do DNA genômico a partir de isolados bacterianos. A extração de DNA das colônias de *V. parahaemolyticus* foi realizada utilizando o reagente DNAzol® (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante, com adaptações para amostras bacterianas.

Foram utilizadas seis amostras de *Vibrio parahaemolyticus* independentes, isoladas previamente em meio seletivo TCBS. Aproximadamente 500 µL do material foram transferidos para microtubos tipo *Eppendorf* de 1,5 mL contendo 500 µL de DNAzol. As amostras foram homogeneizadas suavemente e colocadas em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (500 µL) foi cuidadosamente transferido para um novo tubo, ao qual se adicionou igual volume de etanol absoluto (100%). A solução foi homogeneizada por inversão e incubada à temperatura ambiente por 3 minutos, favorecendo a precipitação do DNA, visível como uma nuvem branca em suspensão. As amostras foram então centrifugadas novamente a 13.000 rpm por 5 minutos, com descarte do sobrenadante. O pellet resultante foi ressuspenso com 500 µL de etanol a 95%, homogeneizado suavemente por inversão de 3 a 6 vezes e incubado por mais 1 minuto. Nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições, com posterior descarte do sobrenadante. O DNA precipitado foi deixado em secagem à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos. Para a solubilização do DNA, foram adicionados 200 µL de NaOH a 8 mM, seguidos de 20 µL de tampão HEPES a 0,1 M, com posterior homogeneização da solução.

Ao término do processo, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop®, a fim de determinar a concentração e a pureza do DNA. As duas amostras que apresentaram maior concentração e razão 260/280 entre 1,8 e 1,9, indicativas de boa pureza, foram selecionadas para os ensaios de PCR em tempo real, sendo uma identificada como *Vibrio parahaemolyticus* e a outra como *Vibrio spp.*

3.5 PCR em tempo real

As reações em PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o reagente SYBR Green. Para isso, as reações de PCR foram realizadas em 10 µL de volume final

contendo 5 µL de Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen®), 0,3 µL de cada *primer*, 0,1 µL de ROX, 1 µL (10-25 ng) de DNA e 3,3 µL de água ultrapura (Invitrogen®). As condições de ciclagem foram as seguintes: incubação a 50°C por 2 min, seguido da ativação da Platinum®Taq DNA polimerase a 95°C por 2 min, e 40 ciclos de 15 s a 95°C e 30 s a 60°C. Os dados foram coletados durante a etapa de extensão final (60°C). Após, a reação de amplificação, as amostras foram submetidas à análise da Temperatura de *Melting*, a fim de se verificar a curva de especificidade dos amplificados gerados. Na tabela 2, estão detalhados os *primers* e as respectivas regiões-alvo utilizados no ensaio de PCR em tempo real.

Tabela 2 - Descrição dos *primers* utilizados para PCR em tempo real

Espécie	Gene	Nome do primer	Primer	Referência
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	mreB	mreBF	GGGTCTGACACCTGGTAACATT	Chiu <i>et al.</i> , 2008
		mreBR	GAACTTCATCACCTGGGTAAAGC	
<i>Vibrio sp.</i>	16S rRNA	567F 680R	GGCGTAAAGCGCATGCAGGT GAAATTCTACCCCCCTACAG	Thompson <i>et al.</i> , 2004

Fonte: A autora, 2025

3.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas considerando dois grupos experimentais principais: Grupo 1, referente à extração única (DNA bacteriano e DNA do tecido em um único procedimento), e Grupo 2, correspondente à extração separada do DNA bacteriano e do DNA do tecido. Para cada grupo, foram obtidos dados de contagem padronizada em triplicata para cada tratamento, totalizando 15 observações por grupo.

A comparação entre os tratamentos dentro de cada grupo foi realizada por meio de análise de variância unifatorial (ANOVA de fator único: contagem padronizada). O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. Todas as análises estatísticas, bem como a geração dos respectivos gráficos, foram realizadas na plataforma estatística R (versão 4.2.1). Todos os comandos foram detalhados no Apêndice A.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Bioinformática

4.1.1 Escolha de primers, PCR in silico e alinhamento de sequências de *Vibrio* sp.

Com base na análise dos *primers* selecionados para *Vibrio* sp., por meio da plataforma *Primer-BLAST*, foram identificadas 107 sequências compatíveis com diferentes espécies do gênero *Vibrio*. Dentre essas, 21 espécies distintas foram detectadas: *V. alginolyticus* (7), *V. astriarenae* (1), *V. cholerae* (33), *V. cidicci* (1), *V. cincinnatiensis* (2), *V. diabolicus* (1), *V. europaeus* (1), *V. fluvialis* (12), *V. furnissii* (4), *V. harveyi* (1), *V. metoecus* (1), *V. metschnikovii* (2), *V. mimicus* (3), *V. navarrensis* (3), *V. panuliri* (1), *V. parahaemolyticus* (22), *V. ponticus* (1), *V. taketomensis* (2), *V. vulnificus* (4), *V. zhuhaiensis* (1) e *V. ziniensis* (1).

Dentre essas espécies, algumas possuem importância reconhecida na carcinicultura por sua capacidade patogênica. *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus* destacam-se pelo potencial de causar vibriose em camarões, sendo associados a infecções transmitidas por organismos filtradores e amplamente distribuídos em ambientes marinhos (MATAMP & BHAT, 2019; PRUZZO *et al.*, 2016). *V. harveyi* é outro patógeno relevante em fazendas de cultivo, frequentemente relacionado a surtos de mortalidade e à formação de biofilmes, o que dificulta seu controle (PETIT *et al.*, 2024). Embora *V. cholerae* seja mais conhecido por sua importância em saúde pública, cepas não epidêmicas podem causar septicemia em organismos aquáticos (PRUZZO *et al.*, 2016). Já *V. fluvialis* e *V. vulnificus* são encontrados como patógenos oportunistas em sistemas de cultivo, sendo este último também associado a infecções humanas graves (HALDAR, 2012; MANILAL *et al.*, 2010).

O alinhamento realizado no software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) revelou alta conservação entre as sequências analisadas, especialmente nas regiões de anelamento dos *primers*, indicando que os mesmos são adequados para a detecção ampla de espécies pertencentes ao gênero *Vibrio* e não foram observadas substituições nucleotídicas significativas nas posições de ligação dos *primers*. Além disso, as regiões conservadas abrangem a maior parte do amplicon (113 pb), e a seleção dos *primers* considerou critérios como o conteúdo de Guanina e Citosina (GC%) e a temperatura de anelamento, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Características dos *primers* utilizados para detecção de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio* sp. por PCR.

Espécie	Primer	Conteúdo Guanina/Citosina (%)	Comprimento do produto (bp)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	mreBF	50%	506 bp	60,03 °C	Chiu <i>et al.</i> , 2008
	mreBR	50%		58,99 °C	
<i>Vibrio</i> spp.	567F	55%	113 bp	64,34 °C	Thompson <i>et al.</i> , 2004
	680R	45,45%		57,31 °C	

Fonte: A autora, 2025.

4.1.2 Escolha de primers, PCR in silico e alinhamento de sequências de *Vibrio parahaemolyticus*.

A análise dos *primers* selecionados para *Vibrio parahaemolyticus*, realizada por meio da ferramenta Primer-BLAST, revelou a amplificação de 229 sequências pertencentes exclusivamente a essa espécie, sem detecção de qualquer outra espécie do gênero *Vibrio*. Esse resultado evidencia a elevada especificidade dos *primers* utilizados, condição essencial para o diagnóstico molecular confiável.

O alinhamento das sequências, conduzido no software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA), demonstrou alta conservação nas regiões-alvo, sobretudo nos sítios de anelamento dos *primers forward* e *reverse*, indicando a estabilidade e a eficiência dessas regiões para amplificação por qPCR. Não foram identificadas substituições nucleotídicas relevantes nas posições de ligação, reforçando a especificidade do par de *primers*.

Além disso, as regiões conservadas compreendem a maior parte do amplicon (506 pb), e a escolha dos *primers* levou em consideração parâmetros fundamentais como o conteúdo de Guanina e Citosina (50%) e as temperaturas de anelamento (Tm de 60,03 °C para o primer F e 58,99 °C para o R), conforme apresentado na Tabela 1.

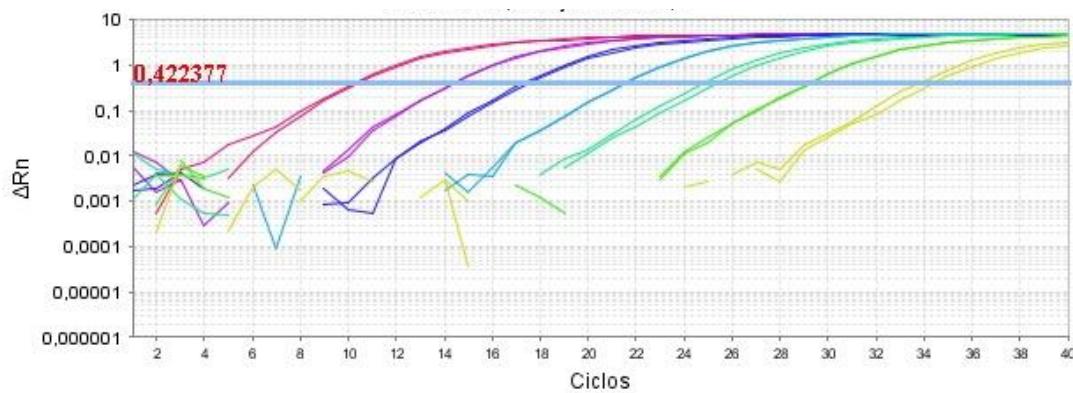
4.2 Análise das curvas de amplificação, *melting* e padrão dos controles positivos por PCR em tempo real

4.2.1 *Vibrio* sp.

O gráfico de amplificação gerado (Gráfico 1) demonstrou o comportamento cinético das amostras positivas para *Vibrio* sp. ao longo dos 40 ciclos da PCR em tempo real. Todas as curvas apresentaram o perfil típico de amplificação exponencial, com aumento progressivo da fluorescência (ΔRn) após a fase lag (fase inicial). A linha de limiar (*threshold*), fixada em $\Delta Rn \approx 0,42$, permitiu a determinação dos valores de Ct (*Cycle threshold*), os quais variaram entre os diferentes controles testados e refletem as distintas concentrações iniciais de DNA presentes nas amostras.

O valor de *cycle threshold* (Ct) é inversamente proporcional à quantidade inicial de DNA alvo na amostra, ou seja, valores baixos de Ct indicam alta concentração do material genético, enquanto valores elevados refletem quantidades menores. Na prática, o Ct serve como um indicador indireto da carga genética presente, sendo utilizado em contextos clínicos para avaliar, por exemplo, a carga viral e sua correlação com a gravidade da infecção, conforme demonstrado em estudos sobre infecções. (FULLER *et al.*, 2013; GREEN & SAMBROOK, 2018).

Gráfico 1 - Gráfico de Amplificação dos controles positivos para *Vibrio* sp.

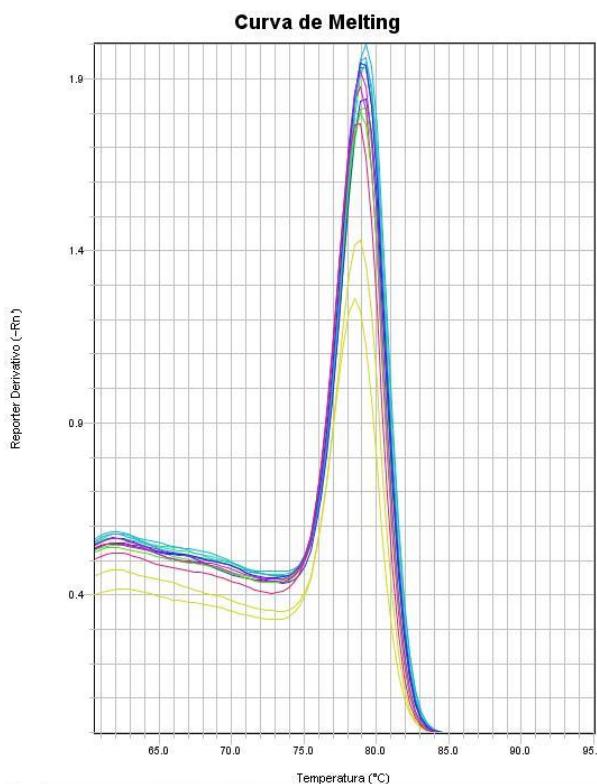


Fonte: A autora, 2025

Complementando essa análise, o Gráfico 2 apresenta a curva de *melting* dos controles positivos, permitindo verificar a especificidade dos produtos amplificados. Observou-se um único pico de *melting* para todas as amostras, com valores de temperatura de

melting (T_m) concentrados entre aproximadamente 83,5 °C e 84,5 °C. A ausência de picos adicionais ou alargados indica a não formação de dímeros. Ademais houve sobreposição dos picos entre os diferentes controles.

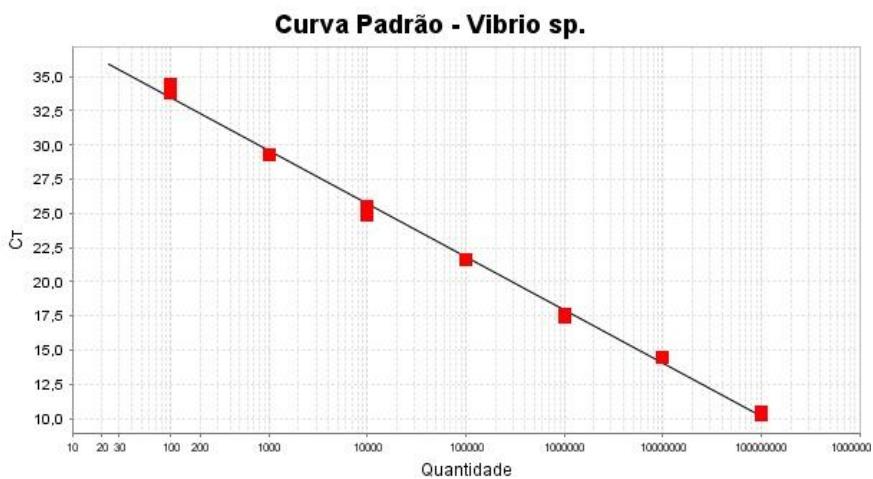
Gráfico 2 - Curva de *Melting* dos controles positivos para *Vibrio* sp.



Fonte: A autora, 2025.

Adicionalmente, o Gráfico 3 apresenta a curva padrão obtida a partir de diluições seriadas do controle positivo para *Vibrio* sp., sendo esta essencial para avaliar a eficiência da reação de PCR em tempo real. A curva evidenciou uma relação linear entre a quantidade de DNA (em escala logarítmica) e os valores de C_t , com inclinação negativa, como esperado para uma amplificação eficiente. Ainda foi observada linearidade, e distribuição uniforme dos pontos, isto é, a reação apresentou comportamento consistente em diferentes concentrações do alvo.

Gráfico 3 - Curva-padrão dos controles positivos para *Vibrio* sp.

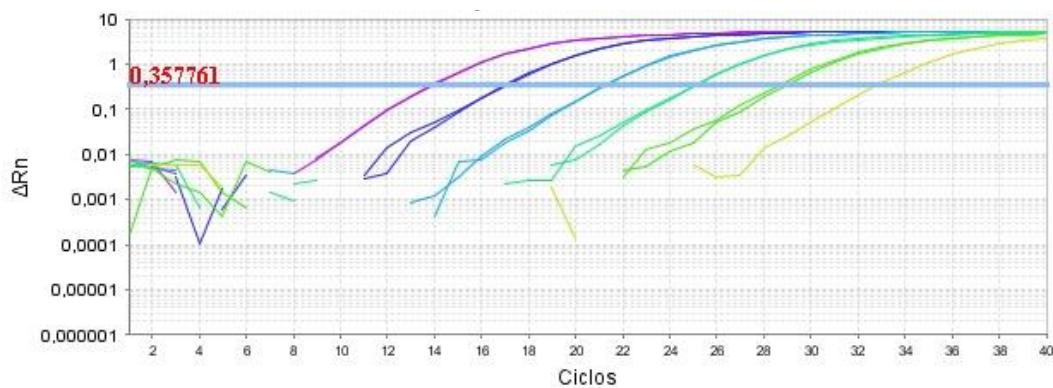


Fonte: A autora, 2025.

4.2.2 *Vibrio parahaemolyticus*

A curva de amplificação (gráfico 4) obtida a partir dos controles positivos demonstraram o comportamento exponencial característico das reações bem sucedidas de qPCR, com aumento gradual da fluorescência (ΔRn) ao longo dos ciclos. O valor de *threshold* foi estabelecido em aproximadamente 0,357, permitindo a determinação dos valores de Ct. A especificidade das reações foi avaliada por meio da curva de *melting* apresentada no gráfico 5, nela observou-se a presença de um único pico de dissociação para todos os controles positivos, com temperaturas de *melting* (Tm) concentradas entre 81 °C e 83 °C e sobreposição dos picos entre as amostras.

Gráfico 4 - Gráfico de Amplificação dos controles-positivos para *Vibrio parahaemolyticus*.

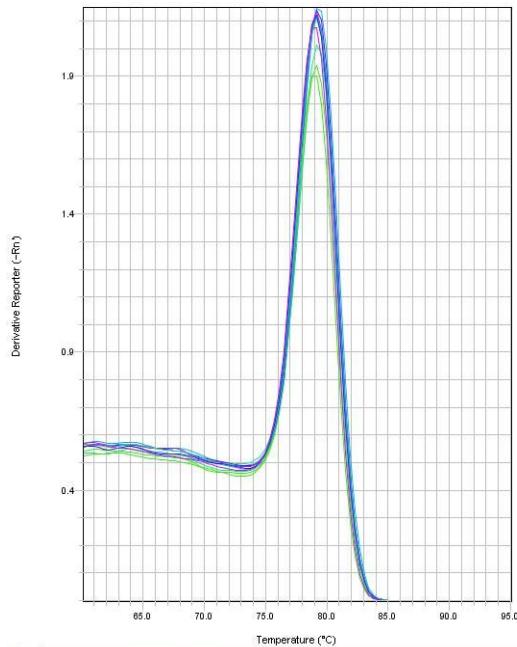


Fonte: A autora, 2025.

Complementarmente, a curva padrão representada no Gráfico 6 foi construída com base em diluições seriadas do controle positivo. A linearidade entre a quantidade de

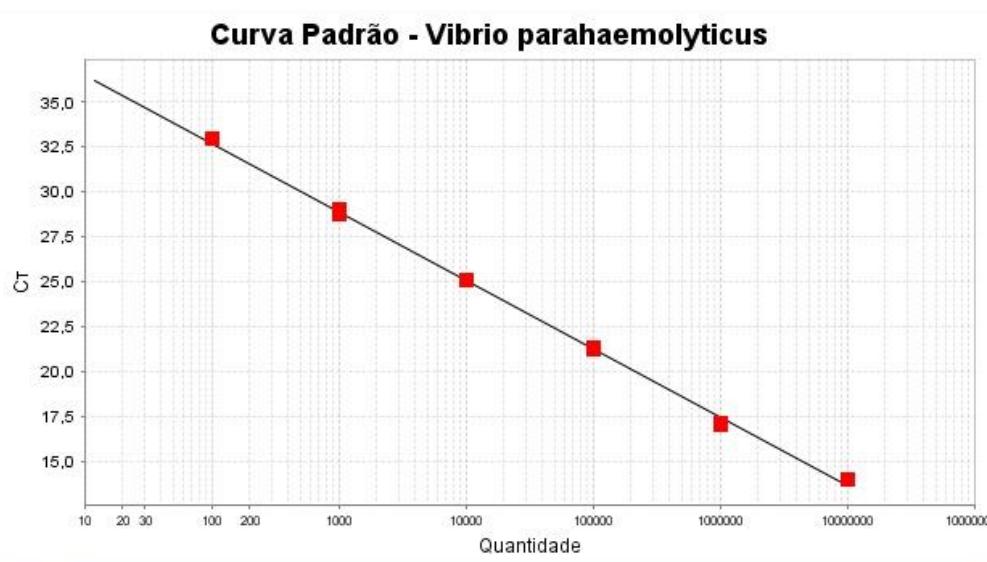
DNA (em escala logarítmica) e os respectivos valores de Ct foi evidente, com inclinação negativa, como esperado para uma reação de PCR eficiente. Notou-se também uma disposição uniforme dos pontos ao longo da linha de regressão.

Gráfico 5 - Curva de *Melting* dos controles positivos para *Vibrio parahaemolyticus*.



Fonte: A autora, 2025.

Gráfico 6 - Curva-padrão dos controles positivos para *Vibrio parahaemolyticus*.



Fonte: A autora, 2025.

4.3 Análise estatística

4.3.1 *Vibrio* sp.

Os resultados apresentados na Tabela 4 evidenciam uma tendência clara de aumento na média das variáveis analisadas em função da concentração do gênero *Vibrio* do DNA obtido de amostras compostas por tecido e inóculo de *Vibrio* sp., que variou de 10^4 a 10^8 UFC/mL entre as amostras. Observa-se que a quantidade média de número de cópias de DNA do alvo foi significativamente menor no tratamento V1 ($2,35 \pm 0,106$) e aumentou gradativamente até o tratamento V5 ($3,98 \pm 0,039$).

Os resultados apresentados na Tabela 5 demonstram uma clara tendência de aumento na média da variável analisada conforme se eleva a concentração de DNA de *Vibrio* sp. adicionada ao DNA tecidual. A amostra IV1, composta por 100 ng de DNA tecidual e apenas 1 ng de DNA de *Vibrio* sp., apresentou a menor média ($28,2 \pm 1,6$). À medida que a concentração de DNA de *Vibrio* sp. aumentou nas amostras subsequentes, observou-se um crescimento progressivo nos valores médios, sendo a IV5 a amostra que apresentou a menor média ($102 \pm 6,75$).

Tabela 4 - Resultados descritivos por amostra utilizados na análise de variância (ANOVA) entre diferentes diluições padrão do DNA total extraído (tecido+inóculo) de *Vibrio* sp. V1 = Concentração 10^4 ; V2 = Concentração 10^5 ; V3 = Concentração 10^6 ; V4 = Concentração 10^7 ; V5 = Concentração 10^8 . F = 749,3; p < 0,05.

Amostra	Média ± Desvio padrão
V1	$2,35 \pm 0,106$
V2	$2,89 \pm 0,025$
V3	$3,35 \pm 0,061$
V4	$3,75 \pm 0,021$
V5	$3,98 \pm 0,039$

Fonte: A autora, 2025.

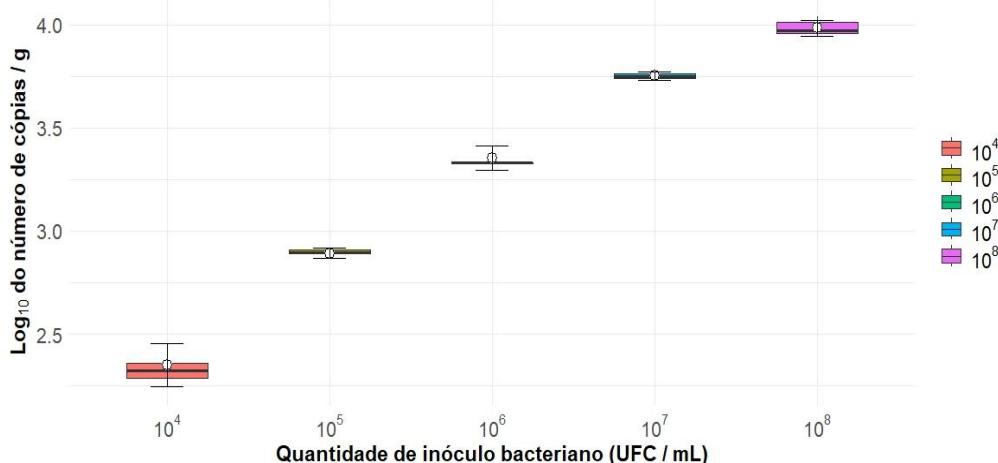
Tabela 5 - Resultados descritivos por amostra utilizados na análise de variância (ANOVA) entre diferentes concentrações de DNA de *Vibrio sp* por 100 mg de DNA tecidual. IV1 = 1 ng de DNA *Vibrio sp.*; IV2 = 5 ng de DNA *Vibrio sp.*; IV3 = 10 ng de DNA *Vibrio sp.*; IV4 = 20 ng de DNA *Vibrio sp.*; IV5 = 25 ng de DNA *Vibrio sp.*. F = 356; p < 0,05.

Amostra	Média ± Desvio padrão
IV1	$28,2 \pm 1,6$
IV2	$37,6 \pm 1,6$
IV3	$47,2 \pm 2,37$
IV4	$58,3 \pm 3,74$
IV5	$102 \pm 6,75$

Fonte: A autora, 2025

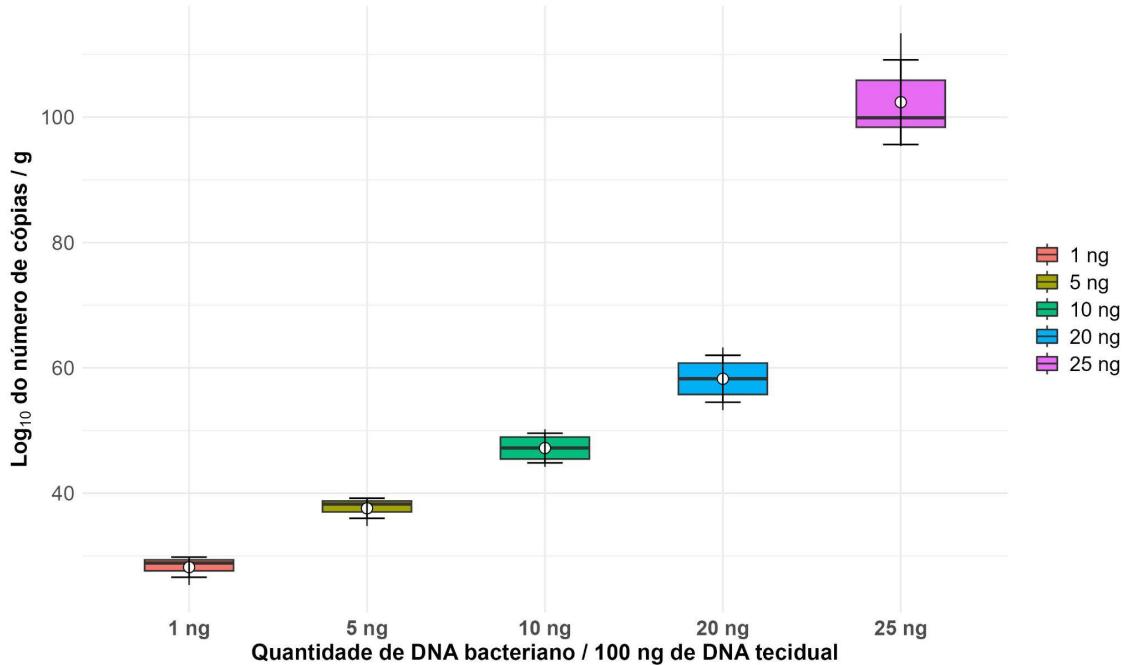
No gráfico 7 e 8 é possível observar essas progressões sugerindo que há uma relação direta entre a concentração de *Vibrio sp* inoculada e a quantidade detectada nas amostras. Esse tipo de evidência é essencial para validar a metodologia de diagnóstico quantitativo, como a PCR em tempo real, no contexto da aquicultura e sanidade de organismos aquáticos. É importante destacar que os desvios padrão foram relativamente baixos em todos os grupos, o que reforça a consistência dos dados obtidos e sugere baixa variabilidade.

Gráfico 7 - Análise da variabilidade do número de cópias/g entre diferentes diluições padrão do DNA extraído (tecido+inóculo) de *Vibrio sp*.



Fonte: A autora, 2025.

Gráfico 8 - Análise da variabilidade do número de cópias/g entre diferentes concentrações de DNA de *Vibrio* sp. por 100 mg de DNA tecidual



Fonte: A autora, 2025.

A análise de variância (ANOVA) das amostras compostas por tecido e inóculo de *Vibrio* sp., revelou um valor de F extremamente elevado ($F = 749,3$), o que por si só indica uma diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos. Tal resultado é corroborado pelo valor de p extremamente baixo ($p < 0,05$). Ainda, as análises de variância das amostras com diferentes concentrações de DNA de *Vibrio* sp. por 100 mg de DNA tecidual apresentaram um valor de $F = 356$, com $p < 0,05$, reforçando que as variações observadas entre os grupos não ocorreram ao acaso. Esses dados confirmam com elevado grau de confiança que pelo menos um dos grupos difere significativamente dos demais. Estatisticamente, isso permite rejeitar a hipótese nula de igualdade entre as médias. Esses dados sustentam a hipótese de que há um efeito significativo associado ao aumento da carga bacteriana.

4.3.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Os dados apresentados na Tabela 6 reforçam a tendência observada anteriormente, agora para *Vibrio parahaemolyticus*, indicando um aumento progressivo na quantidade de cópias de DNA detectadas à medida que se eleva a concentração das amostras compostas por

tecido e inóculo bacteriano. Observa-se que a média logarítmica do número de cópias varia de $4,79 \pm 0,001$ na amostra VP1 até $6,05 \pm 0$ na VP5. Já os dados da Tabela 7 confirmam esse mesmo padrão, evidenciando um incremento gradual nos valores médios conforme se eleva a concentração de DNA bacteriano adicionado às amostras teciduais, passando de $3,53 \pm 0,024$ em IVP1, com 1 ng de DNA, até $4,11 \pm 0,006$ em IVP5, com 25 ng. Esse crescimento contínuo evidencia uma correlação direta entre a carga bacteriana inoculada e a quantidade de DNA detectada por PCR em tempo real.

Os Gráficos 9 e 10, ilustram claramente essas progressões, os grupos com maiores concentrações de DNA apresentam medianas mais elevadas do logaritmo do número de cópias, com intervalos interquartis estreitos. A consistência dos dados é confirmada tanto visualmente pelo gráfico, que mostra baixa dispersão em todos os grupos, quanto numericamente pelos baixos desvios padrão. Essa baixa variabilidade intra-grupo sugere alta precisão nas medidas.

Tabela 6 - Resultados descritivos por amostra utilizados na análise de variância (ANOVA) entre diferentes diluições padrão do DNA total extraído (tecido+inóculo) de *Vibrio parahaemolyticus*. VP1 = Concentração 10^4 ; VP2 = Concentração 10^5 ; VP3 = Concentração 10^6 ; VP4 = Concentração 10^7 ; VP5 = Concentração 10^8 . F = 2308594; p < 0,05.

Amostra	Média ± Desvio padrão
VP1	$4,79 \pm 0,001$
VP2	$5,19 \pm 0$
VP3	$5,42 \pm 0$
VP4	$5,61 \pm 0$
VP5	$6,05 \pm 0$

Fonte: A autora, 2025.

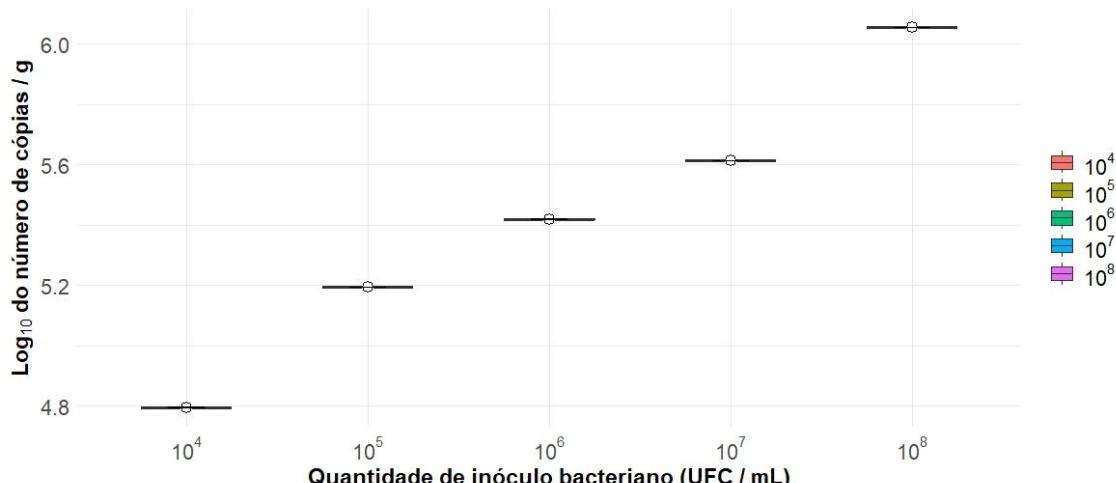
Tabela 7 - Resultados descritivos por amostra utilizados na análise de variância (ANOVA) entre diferentes concentrações de DNA de *Vibrio parahaemolyticus* por 100 mg de DNA tecidual. IVP1 = 1 ng de DNA *Vibrio parahaemolyticus*; IVP2 = 5 ng de DNA *Vibrio parahaemolyticus*; IVP3 = 10 ng de DNA *Vibrio parahaemolyticus*; IVP4 = 20 ng de DNA *Vibrio parahaemolyticus*; IVP5 = 25 ng de DNA *Vibrio parahaemolyticus*. F = 1720; p < 0,05.

Amostra	Média ± Desvio padrão
IVP1	3,53 ± 0,024
IVP2	3,79 ± 0,013
IVP3	3,94 ± 0,009
IVP4	4,03 ± 0,007
IVP5	4,11 ± 0,006

Fonte: A autora, 2025

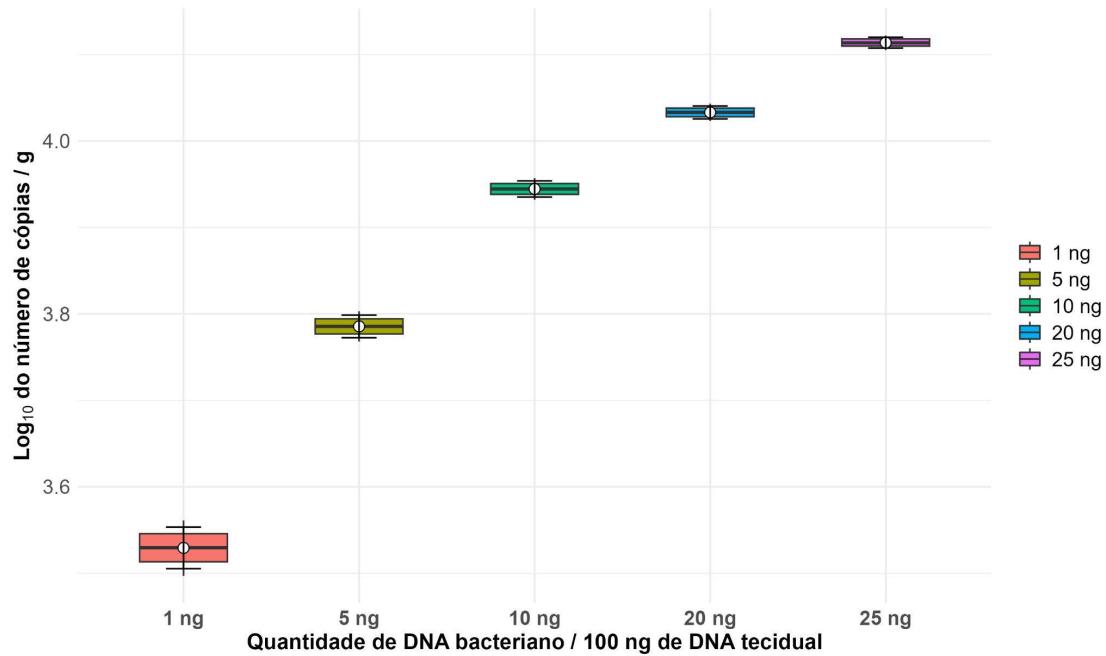
A análise estatística das amostras compostas por tecido e inóculo bacteriano revelou um valor de F extremamente elevado ($F = 2308594$), indicando uma diferença robusta entre as médias dos grupos. Esse achado é estatisticamente confirmado pelo valor de p extremamente baixo ($p < 0,05$). Ademais, a análise estatística das amostras de DNA bacteriano adicionadas às amostras teciduais apresentou um valor de $F = 1720$, com $p < 0,05$, permitindo rejeitar com alto grau de confiança a hipótese nula de igualdade entre as médias. Esses resultados sustentam a hipótese de que o aumento da carga bacteriana tem um efeito significativo sobre a quantidade de DNA detectável.

Gráfico 9 - Análise da variabilidade do número de cópias/g entre diferentes diluições padrão do DNA extraído (tecido+inoculo) de *Vibrio parahaemolyticus*.



Fonte: A autora, 2025

Gráfico 10 - Análise da variabilidade do número de cópias/g entre diferentes concentrações de DNA de *Vibrio parahaemolyticus* por 100 mg de DNA tecidual



Fonte: A autora, 2025

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise Bioinformática

Nesse estudo as regiões conservadas abrangeram a maioria do amplicon (~113 pb), esse tamanho representa um bom equilíbrio entre eficiência de amplificação, permitindo uma amplificação rápida e consistente, mantendo boa sensibilidade e especificidade, que são características cruciais para aplicações diagnósticas e quantitativas da qPCR (BANKO *et al.*, 2021; RUIJTER *et al.*, 2021). sendo que não foram observadas substituições nucleotídicas significativas nas posições de ligação dos *primers*, o que reforça sua robustez e universalidade dentro do grupo-alvo. A partir do alinhamento, pôde-se confirmar que os *primers* utilizados apresentam boa cobertura para *Vibrio* sp. e *Vibrio parahaemolyticus* sem indicar anelamento com espécies não relacionadas, o que valida sua aplicação em protocolos de PCR em tempo real.

A escolha de *primers* direcionados a regiões conservadas do DNA, é essencial para garantir uma identificação taxonômica precisa e ampla cobertura da diversidade microbiana (TENG *et al.*, 2018; WEAR *et al.*, 2018). Nesse contexto, os *primers* escolhidos tiveram isso como pré - requisito. A avaliação *in silico* permite prever a cobertura taxonômica e especificidade dos *primers*, economizando tempo e recursos para identificar possíveis problemas antes dos experimentos práticos. Por exemplo, um estudo demonstrou que *primers* não-metazoanos recuperaram apenas 2,6% das sequências de metazoários, enquanto amplificaram 80,4% de outros eucariotos (CAMPO *et al.*, 2019). Portanto, essa análise prévia ajuda a selecionar os *primers* mais promissores para testes posteriores.

5.2 Análise das curvas de amplificação, *melting* e padrão dos controles positivos por PCR em tempo real.

As curvas de amplificação obtidas neste estudo apresentaram um perfil exponencial, essencial para a quantificação precisa de ácidos nucleicos em PCR em tempo real, como demonstrado por Debode *et al.* (2017). Esse padrão é influenciado pela eficiência e especificidade dos *primers*, que, segundo Garafutdinov *et al.* (2020), o desenho adequado dos *primers* é um dos fatores determinantes para o desempenho da reação, influenciando diretamente a forma e a definição das curvas de amplificação geradas. No presente trabalho, todas as amostras positivas para *Vibrio* sp. e *Vibrio parahaemolyticus* mostraram aumento da

fluorescência após a fase lag, comportamento típico de reações eficientes, evidenciado pelo aumento progressivo da fluorescência (ΔR_n) logo após a fase lag.

Durante a fase exponencial da PCR, o crescimento da fluorescência é proporcional à quantidade de produto gerado, o que permite estimar a concentração inicial do DNA a partir do valor de Ct, conforme Moniri *et al.* (2019). Observou-se que amostras com maior carga genética cruzaram o limiar de detecção em menos ciclos, resultando em valores de Ct mais baixos, enquanto concentrações menores de DNA exigiram mais ciclos, apresentando valores de Ct mais elevados. Essa relação inversa é mencionada por Buchan *et al.* (2020) e reforça a sensibilidade do ensaio utilizado. No contexto deste estudo, essa variação entre os controles positivos evidencia a capacidade do método em detectar diferenças na concentração do inóculo com precisão, sendo útil tanto para análises quantitativas quanto semiquantitativas.

A análise da curva de *melting* foi igualmente importante, especialmente por envolver o uso do corante *SYBR Green*, que se liga a qualquer DNA de fita dupla. Essa etapa permite verificar a especificidade da amplificação com base na temperatura de dissociação (Tm) dos produtos gerados. Como descrito por Wan *et al.* (2016), amplicons específicos tendem a apresentar picos únicos e bem definidos de fusão, enquanto dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos fundem em temperaturas mais baixas e geram perfis distintos (UNTERGASSER *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021). Quando ocorre a formação de dímeros de *primers*, geralmente devido a *primers* com regiões complementares entre si, isso leva à amplificação de produtos não desejados que não são os alvos específicos pretendidos. Esses produtos adicionais afetam a análise da curva de fusão, introduzindo picos adicionais que não envolvem ao produto de interesse. Isso dificulta a distinção entre o produto correto e os parceiros, levando a uma possível interpretação errada dos dados (GARAFUTDINOV *et al.*, 2020).

Neste trabalho, todas as amostras exibiram um único pico de fusão, com Tm entre 83,5 °C e 84,5 °C, o que indica que apenas produtos específicos foram amplificados. A ausência de picos secundários reforça a eficiência dos *primers* e a consistência do protocolo adotado. Como destacam Shahrajabian e Sun (2024), essa análise é especialmente útil em reações com *SYBR Green*, já que permite avaliar a qualidade da amplificação sem a necessidade de sondas ou múltiplos canais fluorescentes. Além de confirmar a identidade dos produtos amplificados, essa verificação funciona como um controle de qualidade essencial, garantindo a confiabilidade dos resultados (ANDERSSON *et al.*, 2015; NAKAGAWA *et al.*, 2020).

Embora a qPCR seja muito utilizada para quantificação, mas para alcançar uma quantificação confiável, é preciso construir uma curva padrão com diluições conhecidas do DNA-alvo (DRANDI *et al.*, 2018; TANG *et al.*, 2016). Essa curva também é fundamental para estimar a eficiência da reação, que idealmente deve estar entre 95% e 105% (JUNG *et al.*, 2016). No presente estudo, a curva padrão apresentou linearidade entre a concentração de DNA e os respectivos valores de Ct, com uma inclinação negativa característica de amplificações eficientes. A distribuição uniforme dos pontos ao longo da regressão reforça a sensibilidade do método e a confiabilidade dos dados gerados, validando sua aplicação para quantificação do DNA de *Vibrio* sp. e *Vibrio parahaemolyticus* em diferentes contextos experimentais.

Em síntese, a análise conjunta das curvas de amplificação, *melting* e padrão confirma que o protocolo de qPCR estabelecido é sensível, específico e reproduzível, sendo adequado para a detecção molecular de *Vibrio parahaemolyticus* em diferentes concentrações.

5.3 Análise estatística

A aplicação da PCR em tempo real (qPCR) se destaca como uma ferramenta sensível e específica para a detecção de patógenos em ambientes aquáticos, principalmente, quando aliada ao uso de diluições controladas para indicar limites de detecção. Estudos mostram a importância dessa abordagem para a padronização e validação de métodos diagnósticos.

Rasmussen *et al.* (2018), por exemplo, desenvolveram um ensaio de qPCR voltado para a detecção de *Vibrio anguillarum* em sistemas de alimentação viva não axênicos. Com base em diluições conhecidas do patógeno, os autores estabeleceram o limite de detecção do ensaio, que se mostrou eficaz mesmo em concentrações tão baixas quanto 10^4 UFC/mL, quando inoculado em culturas de microcrustáceos, os copépodes, para verificar se o mesmo era um vetor da doença. Essa estratégia reforça a aplicabilidade do qPCR em animais inoculados com bactérias, mesmo em baixas concentrações do inóculo bacteriano.

Da mesma forma, Shahin *et al.* (2022) validaram um ensaio qPCR TaqMan para detecção de cepas de *Lactococcus* associadas à lactococose em peixes. Utilizando DNA previamente tipado, os autores alcançaram um limite de detecção de apenas quatro cópias do amplicon, demonstrando elevada sensibilidade tanto em amostras biológicas quanto ambientais. Esses resultados evidenciam o potencial do qPCR como ferramenta confiável em protocolos de diagnóstico de patógenos emergentes na aquicultura.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram baixa variabilidade intra-grupo em todas as concentrações testadas de *Vibrio* sp., (Tabela 2 e 3) e *Vibrio parahaemolyticus* (Tabela 4 e 5) conforme evidenciado pelos desvios-padrão reduzidos nas médias do número de cópias de DNA. Esse achado é particularmente relevante, pois a consistência interna entre as repetições experimentais é um indicativo direto da precisão analítica da metodologia aplicada. Em ensaios de qPCR, esse fator tem sido amplamente reconhecido como essencial para garantir confiabilidade e reproduzibilidade, especialmente em estudos com organismos aquáticos.

Hu *et al.* (2018), ao avaliarem genes de referência para qPCR em *Macrobrachium nipponense*, enfatizam que a baixa variabilidade entre as amostras de um mesmo grupo é condição indispensável para a normalização adequada dos dados e, consequentemente, para a interpretação precisa de resultados de expressão gênica. Utilizando diferentes algoritmos estatísticos, os autores confirmaram que a estabilidade intra-grupo é crítica para a robustez de análises moleculares em crustáceos.

De forma semelhante, Xing *et al.* (2023) desenvolveram um ensaio de qPCR para detecção de *Metschnikowia bicuspidata* em *Eriocheir sinensis*, reportando coeficientes de variação inferiores a 1% dentro dos grupos avaliados. Tal precisão foi considerada fundamental para assegurar a confiabilidade da quantificação do patógeno, reforçando a necessidade de uniformidade nos valores obtidos entre repetições técnicas.

No presente estudo, a baixa dispersão dos dados dentro dos grupos, aliada à significância estatística demonstrada pela ANOVA, corrobora a robustez da metodologia empregada, ou seja, com a capacidade da metodologia de produzir resultados confiáveis, consistentes e precisos mesmo diante de pequenas variações nas condições experimentais.

Esses achados indicam que o sistema de detecção utilizado não apenas é sensível à variação nas concentrações de *Vibrio* sp., e *Vibrio parahaemolyticus* como também produz resultados consistentes dentro de cada condição experimental. Tal estabilidade é especialmente valiosa em pesquisas com organismos aquáticos, nos quais fatores ambientais e biológicos podem introduzir variabilidade significativa caso não haja um controle rigoroso das condições analíticas.

5.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A PCR em tempo real (qPCR) tem se consolidado como uma ferramenta essencial no diagnóstico molecular de patógenos em ambientes aquícolas, superando

significativamente a PCR convencional em diversos aspectos técnicos e aplicados. Em primeiro lugar, destaca-se a rapidez na obtenção dos resultados. Enquanto a convencional exige etapas posteriores de visualização em gel de agarose, a qPCR permite a detecção em tempo real, sem a necessidade de eletroforese, reduzindo o tempo total da análise para menos de uma hora (YANG *et al.*, 2020). Essa agilidade é determinante para tomadas de decisão imediatas no manejo sanitário, principalmente em cultivos intensivos de camarões e peixes.

Outro diferencial é a capacidade de quantificação da carga patogênica, algo que não é possível com a PCR tradicional, que fornece apenas um resultado qualitativo (positivo/negativo). A quantificação precisa por qPCR permite avaliar a gravidade da infecção, monitorar a progressão da doença e até mesmo estimar a eficácia de medidas terapêuticas ou profiláticas aplicadas no cultivo (NGUYEN *et al.*, 2018; OLVEIRA *et al.*, 2021; CHIN *et al.*, 2021; SHAHIN *et al.*, 2022). Estudos mostram que a qPCR pode detectar cargas extremamente baixas de DNA, com limites de detecção que chegam a 10 cópias por reação (STILWELL *et al.*, 2018).

Além disso, a qPCR apresenta elevada sensibilidade e especificidade analítica, o que reduz a ocorrência de falsos positivos e negativos. Isso é possível, em parte, devido à análise das curvas de *melting* e ao uso de sondas específicas, como nos ensaios TaqMan, capazes de detectar e quantificar simultaneamente múltiplos alvos em uma única reação com alta precisão (LIU *et al.*, 2019). No contexto desse estudo, a presença de picos únicos de *melting* para *Vibrio* sp. e *Vibrio parahaemolyticus* (Gráficos 2 e 5) reforça a especificidade dos *primers* e ausência de produtos inespecíficos, característica desejável em ensaios diagnósticos.

Os resultados do presente trabalho demonstraram baixa variabilidade intra-grupo, tanto para *Vibrio* sp. quanto para *V. parahaemolyticus*, com desvios-padrão reduzidos entre as amostras. Isso reforça a consistência dos dados obtidos e está em consonância com a literatura, que reporta coeficientes de variação inferiores a 5% em ensaios bem otimizados (STILWELL *et al.*, 2018).

Do ponto de vista da aplicabilidade em campo, sistemas portáteis de qPCR têm sido desenvolvidos e já permitem diagnósticos in loco em menos de 50 minutos, viabilizando o monitoramento sanitário em tempo real, inclusive em amostras ambientais e de tecido animal (NGUYEN *et al.*, 2018). Métodos como o RPA em tempo real também têm sido explorados para *Vibrio vulnificus*, com detecção em temperaturas baixas (39 °C) e tempo reduzido de apenas 2 a 14 minutos (YANG *et al.*, 2020).

Diversos trabalhos reforçam o uso da qPCR no diagnóstico de espécies do gênero *Vibrio*, frequentemente associadas a surtos em sistemas de cultivo. Métodos multiplex vêm sendo aplicados, como aquele descrito por Xu *et al.* (2018), que permite detectar simultaneamente o gene groEL e genes de virulência (tdh e trh) de *V. parahaemolyticus*, com alta sensibilidade e detecção mínima de 10^4 a 10^5 UFC/mL. Liu *et al.* (2019) também desenvolveram um ensaio TaqMan de alta capacidade para 12 espécies de *Vibrio*, com limites de detecção entre 56 e 960 UFC/mL, aplicáveis tanto em culturas puras quanto em matrizes complexas como carne de pescado.

Portanto, a literatura reforça que a qPCR é uma ferramenta crucial para garantir a biossegurança na aquicultura, permitindo intervenções sanitárias precoces, controle mais rigoroso de surtos e maior sustentabilidade na produção (BONNY *et al.*, 2020; PIRES *et al.*, 2020). Sua aplicação contribui diretamente para a segurança alimentar e para a redução de perdas econômicas associadas a enfermidades infecciosas em organismos aquáticos. Em síntese, considerando os dados obtidos neste trabalho aliados à literatura, reforça-se que a PCR em tempo real apresenta vantagens significativas sobre a PCR convencional. Sua sensibilidade, especificidade, capacidade de quantificação e confiabilidade tornam essa técnica indispensável para o diagnóstico preciso de patógenos como *Vibrio* sp. e *V. parahaemolyticus* na aquicultura, permitindo intervenções sanitárias mais eficazes e sustentáveis, promovendo a biosseguridade em sistemas de cultivo.

6 CONCLUSÃO

- A análise bioinformática e experimental confirmou que os *primers* utilizados são específicos, eficientes e bem ajustados para qPCR.
- A progressão da carga bacteriana resultou em diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, evidenciando a alta sensibilidade do protocolo.
- Portanto, foi possível desenvolver e padronizar um protocolo de qPCR eficiente para a detecção de *Vibrio* sp. e *Vibrio parahaemolyticus*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho representa um passo importante na busca por métodos diagnósticos mais rápidos, sensíveis e específicos para a detecção de *Vibrio* sp. e *Vibrio parahaemolyticus* em *Penaeus vannamei*, utilizando a técnica de PCR em tempo real. No entanto, para que os resultados obtidos em laboratório sejam validados e aplicados com segurança em ambientes de cultivo, torna-se essencial a realização de ensaios *in vivo* com os camarões.

A condução de experimentos controlados, utilizando animais vivos sob condições similares às da produção aquícola, permitirá avaliar a eficácia do método na detecção precoce de infecções, bem como sua correlação com manifestações clínicas e taxas de mortalidade. Essa etapa é fundamental para comprovar a aplicabilidade prática do protocolo proposto e garantir que ele reflita com fidelidade os desafios enfrentados em campo.

APÊNDICE A - COMANDO UTILIZADO NO SOFTWARE R PARA A ANÁLISE ESTATÍSTICA (ANOVA) DAS AMOSTRAS.

```

# Carregar pacotes
library(tidyverse)
library(ggpubr)

# Etapa 1: Ler CSV com separador ; (padrão Brasil)
dados <- read.csv2(file.choose(), header = FALSE, stringsAsFactors =
FALSE)

# Etapa 2: Verificar e renomear colunas
if (ncol(dados) != 5) {
  stop("O arquivo CSV precisa ter exatamente 5 colunas.")
}
colnames(dados) <- c("A", "B", "C", "D", "E")

# Etapa 3: Substituir vírgulas por pontos e converter para numérico
dados <- dados %>%
  mutate(across(everything(), ~gsub(", ", ".", .))) %>%
  mutate(across(everything(), ~as.numeric(.)))

# Etapa 4: Remover linhas totalmente vazias
dados <- dados[rowSums(is.na(dados)) < ncol(dados), ]

# Etapa 5: Converter para formato longo
dados_long <- pivot_longer(
  dados,
  cols = everything(),
  names_to = "Grupo",
  values_to = "Valor"
) %>% filter(!is.na(Valor))

# Etapa 6: Corrigir níveis do fator com grupos válidos
dados_long$Grupo <- factor(dados_long$Grupo)

# Etapa 7: Verificar número mínimo de grupos
if (nlevels(dados_long$Grupo) < 2) {
  stop("Erro: A ANOVA requer pelo menos 2 grupos com dados válidos.")
}

# Etapa 8: ANOVA
modelo <- aov(Valor ~ Grupo, data = dados_long)
cat("\n--- Resultado da ANOVA ---\n")
print(summary(modelo))

# Etapa 9: Estatísticas descritivas
estatisticas <- dados_long %>%
  group_by(Grupo) %>%

```

```

summarise(
  Media = mean(Valor),
  Desvio_Padrao = sd(Valor),
  N = n()
)
cat("\n--- Estatísticas descritivas por grupo ---\n")
print(estatisticas)

# Etapa 10: Teste de Tukey (comparações par a par)
tukey <- TukeyHSD(modelo)
cat("\n--- Teste de Tukey HSD (comparações par a par) ---\n")
print(tukey)

# Etapa 11: Rótulos sobreescritos (Unicode) para eixo X e legenda
rotulos_grupo <- c("104", "105", "106", "107", "108")
names(rotulos_grupo) <- c("A", "B", "C", "D", "E")

# Etapa 12: Criar gráfico com todos os ajustes
grafico <- ggplot(dados_long, aes(x = Grupo, y = Valor)) +
  geom_boxplot(aes(fill = Grupo), outlier.shape = NA, width = 0.5) +
  stat_summary(fun = mean, geom = "point", shape = 21, size = 3, fill =
  "white") +
  stat_summary(fun.data = mean_sdl, fun.args = list(mult = 1),
              geom = "errorbar", width = 0.2, color = "black") +
  scale_x_discrete(labels = rotulos_grupo) +
  scale_fill_discrete(labels = rotulos_grupo) +
  labs(
    x = NULL,
    y = expression(bold(Log[10])~"do número de cópias / g")),
    fill = NULL
  ) +
  theme_minimal() +
  theme(
    plot.title = element_blank(),
    axis.title.y = element_text(face = "bold"),
    axis.title.x = element_text(face = "bold"),
    axis.text.x = element_text(face = "bold")
  )

# Etapa 13: Mostrar e salvar
print(grafico)
ggsave("anova_resultado.jpeg", plot = grafico, width = 8, height = 6,
dpi = 300)

```

REFERÊNCIAS

- ABIDIN, Zaenal; HUANG, Huai-Ting; LIAO, Zhen-Hao; CHEN, Bo-Ying; WU, Yu-Sheng; LIN, Yu-Ju; NAN, Fan-Hua. Moringa oleifera Leaves' Extract Enhances Nonspecific Immune Responses, Resistance against *Vibrio alginolyticus*, and Growth in Whiteleg Shrimp (*Penaeus vannamei*). **Animals**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 42, 26 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ani12010042>.
- ALBALAT, Amaya; ZACARIAS, Simão; COATES, Christopher J.; NEIL, Douglas M.; PLANELLAS, Sonia Rey. Welfare in Farmed Decapod Crustaceans, With Particular Reference to *Penaeus vannamei*. **Frontiers In Marine Science**, [S.L.], v. 9, p. 0, 6 maio 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2022.886024>.
- ALI, Sardar; XIE, Jianmin; ZADA, Sahib; HU, Zhong; ZHANG, Yueling; CAI, Runlin; WANG, Hui. Bacterial community structure and bacterial isolates having antimicrobial potential in shrimp pond aquaculture. **Amb Express**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1, 23 jun. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-022-01423-9>.
- ÁLVAREZ-CONTRERAS, Ana Karen; QUIÑONES-RAMÍREZ, Elsa Irma; VÁZQUEZ-SALINAS, Carlos. Prevalence, detection of virulence genes and antimicrobial susceptibility of pathogen *Vibrio* species isolated from different types of seafood samples at “La Nueva Viga” market in Mexico City. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.L.], v. 114, n. 9, p. 1417-1429, 13 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-021-01591-x>.
- AMIIN, Muhammad Kholiqul; LAHAY, Almira Fardani; PUTRIANI, Rizha Bery; REZA, Muhammad; PUTRI, Septi Malidda Eka; SUMON, Md. Afsar Ahmed; JAMAL, Mamdoh T.; SANTANUMURTI, Muhammad Browijoyo. The role of probiotics in vannamei shrimp aquaculture performance – A review. **Veterinary World**, [S.L.], n. 0, p. 638-649, mar. 2023. Veterinary World. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2023.638-649>.
- AN, Junru; JIANG, Yangyang; SHI, Bing; WU, Di; WU, Wenming. Low-Cost Battery-Powered and User-Friendly Real-Time Quantitative PCR System for the Detection of Multigene. **Micromachines**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 435, 21 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/mi11040435>.
- ANDERSSON, Daniel; AKRAP, Nina; SVEC, David; GODFREY, Tony e; KUBISTA, Mikael; LANDBERG, Göran; STÅHLBERG, Anders. Properties of targeted preamplification in DNA and cDNA quantification. **Expert Review Of Molecular Diagnostics**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 1085-1100, jul. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.2015.1057124>.
- ARTIKA, I Made; DEWI, Yora Permata; NAINGGOLAN, Ita Margaretha; SIREGAR, Josephine Elizabeth; ANTONJAYA, Ungke. Real-Time Polymerase Chain Reaction: current techniques, applications, and role in covid-19 diagnosis. **Genes**, [S.L.], v. 13, n. 12, p. 2387, 16 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes13122387>.
- ASMILD, Mette; HUKOM, Venticia; NIELSEN, Rasmus; NIELSEN, Max. Is economies of scale driving the development in shrimp farming from *Penaeus monodon* to *LitoPenaeus*

vannamei? The case of Indonesia. **Aquaculture**, [S.L.], v. 579, p. 740178, jan. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740178>.

BAKER-AUSTIN, Craig; OLIVER, James D.; ALAM, Munirul; ALI, Afsar; WALDOR, Matthew K.; QADRI, Firdausi; MARTINEZ-URTAZA, Jaime. *Vibrio spp.* infections. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-19, 21 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>.

BANKO, Ana; PETROVIC, Gordana; MILJANOVIC, Danijela; LONCAR, Ana; VUKCEVIC, Marija; DESPOT, Dragana; CIRKOVIC, Andja. Comparison and Sensitivity Evaluation of Three Different Commercial Real-Time Quantitative PCR Kits for SARS-CoV-2 Detection. **Viruses**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 1321, 8 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v13071321>.

BARDERA, Guillermo; USMAN, Nafiha; OWEN, Matthew; POUNTNEY, Daniel; SLOMAN, Katherine A.; ALEXANDER, Mhairi E. The importance of behaviour in improving the production of shrimp in aquaculture. **Reviews In Aquaculture**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 1104-1132, 22 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12282>.

BARRIOS, Yulaine Corrales; RONCARATI, Alessandra; RÍOS, Leonardo Dávier Martín; GONZÁLEZ, Maikelis Rodríguez; SALOTÉN, Marbelys González; ZALDÍVAR, Yeidel López; ARENAL, Amilcar. Effects of Fructooligosaccharides (FOS) on the Immune Response of the Shrimp *Penaeus vannamei* and on the Reduction in *Vibrio spp.* and *Pseudomonas spp.* in Cultures of Post-Larvae. **Microbiology Research**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 870-882, 8 jul. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microbiolres14030060>.

BONNY, Sharmin Quazi; HOSSAIN, M. A. Motalib; UDDIN, Syed Muhammad Kamal; PULINGAM, Thiruchelvi; SAGADEVAN, Suresh; JOHAN, Mohd Rafie. Current trends in polymerase chain reaction based detection of three major human pathogenic Vibrios. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 62, n. 5, p. 1317-1335, 4 nov. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2020.1841728>.

BONNY, Sharmin Quazi; HOSSAIN, M. A. Motalib; UDDIN, Syed Muhammad Kamal; PULINGAM, Thiruchelvi; SAGADEVAN, Suresh; JOHAN, Mohd Rafie. Current trends in polymerase chain reaction based detection of three major human pathogenic Vibrios. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 62, n. 5, p. 1317-1335, 4 nov. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2020.1841728>.

BRIDGE, Julia A.. Reverse transcription–polymerase chain reaction molecular testing of cytology specimens: pre :analytic and analytic factors. **Cancer Cytopathology**, [S.L.], v. 125, n. 1, p. 11-19, 14 jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.21762>.

BRUMFIELD, Kyle D.; USMANI, Moiz; CHEN, Kristine M.; GANGWAR, Mayank; JUTLA, Antarpreet S.; HUQ, Anwar; COLWELL, Rita R.. Environmental parameters associated with incidence and transmission of pathogenic *Vibrio spp.* **Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 23, n. 12, p. 7314-7340, 25 ago. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.15716>.

BUCHAN, Blake W; HOFF, Jessica s; GMEHLIN, Cameron G; PEREZ, Adriana; FARON, Matthew L; MUÑOZ-PRICE, L Silvia; A LEDEBOER, Nathan. Distribution of SARS-CoV-2

PCR Cycle Threshold Values Provide Practical Insight Into Overall and Target-Specific Sensitivity Among Symptomatic Patients. **American Journal Of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 154, n. 4, p. 479-485, 20 jul. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/aqaa133>.

CAMPO, Javier del; PONS, Maria J.; HERRANZ, Maria; WAKEMAN, Kevin C.; VALLE, Juana del; VERMEIJ, Mark J. A.; LEANDER, Brian S.; KEELING, Patrick J.. Validation of a universal set of primers to study animal-associated microeukaryotic communities. **Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 21, n. 10, p. 3855-3861, 25 jul. 2019. Wiley.

CANELLAS, Anna L. B.; LOPES, Isabelle R.; MELLO, Marianne P.; PARANHOS, Rodolfo; OLIVEIRA, Bruno F. R. de; LAPORT, Marinella S.. *Vibrio* species in an Urban Tropical Estuary: antimicrobial susceptibility, interaction with environmental parameters, and possible public health outcomes. **Microorganisms**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 1007, 7 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9051007>.

CHEN, Mengtao; LAN, Xinyue; ZHU, Longjiao; RU, Ping; XU, Wentao; LIU, Haiyan. PCR Mediated Nucleic Acid Molecular Recognition Technology for Detection of Viable and Dead Foodborne Pathogens. **Foods**, [S.L.], v. 11, n. 17, p. 2675, 2 set. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods11172675>.

CHEN, Zhiwei; HALFORD, Nigel G.; LIU, Chenghong. Real-Time PCR in Plant Research. **Plants**, v. 12, n. 11, p. 2074, 2023. <https://doi.org/10.3390/plants12112074>
 CHIN, Nur Areena; SALIHAH, Nur Thaqifah; SHIVANAND, Pooja; AHMED, Minhaz Uddin. Recent trends and developments of PCR-based methods for the detection of food-borne *Salmonella* bacteria and Norovirus. **Journal Of Food Science And Technology**, [S.L.], v. 59, n. 12, p. 4570-4582, 17 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-021-05280-5>.

CHIU, Shen-Wen; CHEN, Shau-Yan; WONG, Hin-Chung. Localization and Expression of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* under Different Stresses. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 74, n. 22, p. 7016-7022, 15 nov. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01020-08>.

DEBODE, Frédéric; MARIEN, Aline; JANSSEN, Éric; BRAGARD, Claude; BERBEN, Gilbert. The influence of amplicon length on real-time PCR results. **Base**, [S.L.], p. 3-11, 2017. University of Liege. <http://dx.doi.org/10.25518/1780-4507.13461>.

DRANDI, Daniela; FERRERO, Simone; LADETTO, Marco. Droplet Digital PCR for Minimal Residual Disease Detection in Mature Lymphoproliferative Disorders. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 229-256, 2018. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7778-9_14.

DU, Z.-Q.; CIOBANU, D. C.; ONTERU, S. K.; GORBACH, D.; MILEHAM, A. J.; JARAMILLO, G.; ROTHSCHILD, M. F.. A gene-based SNP linkage map for pacific white shrimp, *LitoPenaeus vannamei*. **Animal Genetics**, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 286-294, 6 maio 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.02002.x>.

FORD, Charlotte L.; POWELL, Andy; LAU, Dawn Yan Lam; TURNER, Andrew D.; DHANJI-RAPKOVA, Monika; MARTINEZ-URTAZA, Jaime; BAKER-AUSTIN, Craig.

Isolation and characterization of potentially pathogenic *Vibrio* species in a temperate, higher latitude hotspot. **Environmental Microbiology Reports**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 424-434, 21 jun. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12858>.

FREPLIER, P. F.; SIS, R. F.; BELL, T. A.; LEWIS, D. H. Microscopic and ultrastructural features of necrotizing hepatopancreatitis in Texas cultured shrimp (*Penaeus vannamei*). **Veterinary Pathology**, v. 29, p. 269–277, 1992.

FU, Songzhe; WEI, Dawei; YANG, Qian; XIE, Guosi; PANG, Bo; WANG, Yongjie; LAN, Ruiting; WANG, Qingyao; DONG, Xuan; ZHANG, Xiaojun. Horizontal Plasmid Transfer Promotes the Dissemination of Asian Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease and Provides a Novel Mechanism for Genetic Exchange and Environmental Adaptation. **Msystems**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 1, 28 abr. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/msystems.00799-19>.

FULLER, James A.; NJENGA, M. Kariuki; BIGOGO, Godfrey; AURA, Barrack; OPE, Maurice O.; NDERITU, Leonard; WAKHULE, Lilian; ERDMAN, Dean D.; BREIMAN, Robert F.; FEIKIN, Daniel R.. Association of the CT values of real-time PCR of viral upper respiratory tract infection with clinical severity, Kenya. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 85, n. 5, p. 924-932, 18 mar. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.23455>.

GARAFUTDINOV, Ravil R.; GALIMOVA, Aizilya A.; SAKHABUTDINOVA, Assol R.. The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. **Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids**, [S.L.], v. 39, n. 9, p. 1251-1269, 17 ago. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15257770.2020.1803354>.

GAVRILOV, Momčilo; YANG, Joshua Y. C.; ZOU, Roger S.; MA, Wen; LEE, Chun-Ying; MOHAPATRA, Sonisilpa; KANG, Jimin; LIAO, Ting-Wei; MYONG, Sua; HA, Taekjip. Engineered helicase replaces thermocycler in DNA amplification while retaining desired PCR characteristics. **Nature Communications**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1, 23 out. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-34076-0>.

HAIFA-HARYANI, Wan Omar; AMATUL-SAMAHAH, Md. Ali; AZZAM-SAYUTI, Mohamad; CHIN, Yong Kit; ZAMRI-SAAD, Mohd; NATRAH, I.; AMAL, Mohammad Noor Azmai; SATYANTINI, Woro Hastuti; INA-SALWANY, Md Yasin. Prevalence, Antibiotics Resistance and Plasmid Profiling of *Vibrio spp.* Isolated from Cultured Shrimp in Peninsular Malaysia. **Microorganisms**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1851, 16 set. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10091851>.

HEENATIGALA, P.P.M.; FERNANDO, M.u.L.. Occurrence of bacteria species responsible for Vibriosis in shrimp pond culture systems in Sri Lanka and assessment of the suitable control measures. **Sri Lanka Journal Of Aquatic Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-17, 20 fev. 2016. Sri Lanka Journals Online (JOL). <http://dx.doi.org/10.4038/sljas.v21i1.7481>.

HOA, Tran Thi Tuyet; FAGNON, Mahougnon Siméon; THY, Dang Thuy Mai; CHABRILLAT, Thibaut; TRUNG, Nguyen Bao; KERROS, Sylvain. Growth Performance and Disease Resistance against *Vibrio parahaemolyticus* of Whiteleg Shrimp (*LitoPenaeus vannamei*) Fed Essential Oil Blend (Phyto AquaBiotic). **Animals**, [S.L.], v. 13, n. 21, p. 3320, 25 out. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ani13213320>.

HONG, Xupeng; LU, Liqun; XU, Dan. Progress in research on acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). **Aquaculture International**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 577-593, 8 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10499-015-9948-x>.

HOSSAIN, Md. Mer Mosharraf; UDDIN, Md. Imtiaz; ISLAM, Habiba; FARDOUSH, Jannatul; RUPOM, Md. Ariful Haque; HOSSAIN, Md. Monjur; FARJANA, Nawshin; AFROZ, Rukaiya; HASAN-UJ-JAMAN; ROY, Hironmoy Shovon. Diagnosis, genetic variations, virulence, and toxicity of AHPND-positive *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus monodon*. **Aquaculture International**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 2531-2546, 28 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-020-00607-z>.

HU, Yuning; FU, Hongtuo; QIAO, Hui; SUN, Shengming; ZHANG, Wenyi; JIN, Shubo; JIANG, Sufei; GONG, Yongsheng; XIONG, Yiwei; WU, Yan. Validation and Evaluation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in Macrobrachium Nipponense. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 2258, 1 ago. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19082258>.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Agropecuário 2023: resultados preliminares. Rio de Janeiro: IBGE, 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/camarao/ce>. Acesso em: 04 maio 2025.

JANECKO, Nicol; BLOOMFIELD, Samuel J.; PALAU, Raphaëlle; MATHER, Alison E.. Whole genome sequencing reveals great diversity of *Vibrio spp* in prawns at retail. **Microbial Genomics**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 1, 9 set. 2021. Microbiology Society.
<http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.000647>.

JIANG, Chunqi; TANAKA, Mami; NISHIKAWA, Sayo; MINO, Sayaka; ROMALDE, Jesús L.; THOMPSON, Fabiano L.; GOMEZ-GIL, Bruno; SAWABE, Tomoo. *Vibrio* Clade 3.0: new Vibrionaceae evolutionary units using genome-based approach. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 79, n. 1, p. 1, 14 dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00284-021-02725-0>.

JIE, Junyao; HU, Shiming; LIU, Wenwen; WEI, Qingquan; HUANG, Yizheng; YUAN, Xinxin; REN, Lufeng; TAN, Manqing; YU, Yude. Portable and Battery-Powered PCR Device for DNA Amplification and Fluorescence Detection. **Sensors**, [S.L.], v. 20, n. 9, p. 2627, 5 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/s20092627>.

JONES, David B.; JERRY, Dean R.; KHATKAR, Mehar S.; RAADSMA, Herman W.; STEEN, Hein van Der; PROCHASKA, Jeffrey; FORêt, Sylvain; ZENGER, Kyall R.. A comparative integrated gene-based linkage and locus ordering by linkage disequilibrium map for the Pacific white shrimp, *LitoPenaeus vannamei*. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1, 4 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10515-7>.

JUNG, Seungwon; KIM, Junsun; LEE, Dong Jin; OH, Eun Hae; LIM, Hwasup; KIM, Kwang Pyo; CHOI, Nakwon; KIM, Tae Song; KIM, Sang Kyung. Extensible Multiplex Real-time PCR of MicroRNA Using Microparticles. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1, 11 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep22975>.

KAKIZAKI, Nanako; ASAII, Koji; KURODA, Makoto; WATANABE, Ryutaro; KUJIRAOKA, Manabu; SEKIZUKA, Tsuyoshi; KATAGIRI, Miwa; MORIYAMA, Hodaka; WATANABE, Manabu; SAIDA, Yoshihisa. Rapid identification of bacteria using a multiplex polymerase chain reaction system for acute abdominal infections. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 14, p. 1, 10 jul. 2023. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2023.1220651>.

KUMAR, Santosh; VERMA, Arunima Kumar; SINGH, Shivesh Pratap; AWASTHI, Abhishek. Immunostimulants for shrimp aquaculture: paving pathway towards shrimp sustainability. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 25325-25343, 13 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-021-18433-y>.

KUMAR, Sujeet; KUMAR, Chandra Bhushan; RAJENDRAN, Vidya; ABISHAW, Nishawlini; ANAND, P. S. Shyne; KANNAPAN, S.; NAGALEEKAR, Viswas K.; VIJAYAN, K. K.; ALAVANDI, S. V.. Delineating virulence of *Vibrio campbellii*: a predominant luminescent bacterial pathogen in indian shrimp hatcheries. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1, 4 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-94961-4>.

KUMAR, Vikash; ROY, Suvra; BEHERA, Bijay Kumar; BOSSIER, Peter; DAS, Basanta Kumar. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. **Toxins**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 524, 27 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins13080524>.

KWOK, Carsten Tsun-Ka; YU, Ray Chun-Wai; HAU, Pak-Ting; CHEUNG, Karry Yuen-Ching; NG, Iain Chi-Fung; FUNG, Joshua; WONG, Ivan Tak-Fai; YAU, Miranda Chong-Yee; LIU, Wai-Man; KONG, Hang-Kin. Characteristics and pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* SWS causing high mortality in mud crab (*Scylla serrata*) aquaculture in Hong Kong. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 14, p. 1, 23 jul. 2024. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2024.1425104>.

LACERDA, Luiz Drude de; WARD, Raymond D.; GODOY, Mario Duarte Pinto; MEIRELES, Antônio Jeovah de Andrade; BORGES, Rebecca; FERREIRA, Alexander Cesar. 20-Years Cumulative Impact From Shrimp Farming on Mangroves of Northeast Brazil. **Frontiers In Forests And Global Change**, [S.L.], v. 4, p. 1, 23 abr. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/ffgc.2021.653096>.

LAPEÑA, Ld de; CABILLON, Nar; CATEDRAL, Dd; AMAR, Ec; USERO, Rc; MONOTILLA, Wd; CALPE, At; FERNANDEZ, Ddg; SALOMA, Cp. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. **Diseases Of Aquatic Organisms**, [S.L.], v. 116, n. 3, p. 251-254, 27 out. 2015. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/dao02919>.

LI, Chenglong; LIN, Nan; FENG, Zhihua; LIN, Minhua; GUAN, Biyun; CHEN, Kunsen; LIANG, Wangwang; WANG, Qiaohuang; LI, Miaomiao; YOU, Yu. CRISPR/Cas12a Based Rapid Molecular Detection of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in Shrimp. **Frontiers In Veterinary Science**, [S.L.], v. 8, p. 1, 25 jan. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2021.819681>.

LI, Pengzhen; FENG, Xiaoxuan; CHEN, Baiyan; WANG, Xiaoying; LIANG, Zuyue; WANG, Li. The Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria in Seafood Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction System. **Foods**, [S.L.], v. 11, n. 23, p. 3909, 4 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods11233909>.

LIAO, I Chiu; CHIEN, Yew-Hu. The Pacific White Shrimp, Lito*Penaeus vannamei*, in Asia: the world's most widely cultured alien crustacean. In **The Wrong Place - Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts**, [S.L.], p. 489-519, 2011. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-0591-3_17.

LIU, Ying; CAO, Yang; WANG, Tao; DONG, Qingyang; LI, Junwen; NIU, Chao. Detection of 12 Common Food-Borne Bacterial Pathogens by TaqMan Real-Time PCR Using a Single Set of Reaction Conditions. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1, 13 fev. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00222>.

LOY, J K; DEWHIRST, F e; WEBER, W; FRELIER, P F; GARBAR, T L; TASCA, S I; TEMPLETON, J W. Molecular phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 62, n. 9, p. 3439-3445, set. 1996. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.62.9.3439-3445.1996>.

LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. *Genus: Vibrio*. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/Vibrio>. Acesso em: 2 jun. 2025.
MA, Seohee; KIM, Ahran; LEE, Wonho; KIM, Seonghye; LEE, Sujin; YOON, Dahye; BAE, Jin-Sol; PARK, Chan-II; KIM, Suhkmann. *Vibrio harveyi* Infection Significantly Alters Amino Acid and Carbohydrate Metabolism in Whiteleg Shrimp, Lito*Penaeus vannamei*. **Metabolites**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 265, 25 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo10060265>.

MAI, Hung N; CARO, Luis Fernando Aranguren; CRUZ-FLORES, Roberto; WHITE, Brenda Noble; DHAR, Arun K.. Differentially Expressed Genes in Hepatopancreas of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Tolerant and Susceptible Shrimp (*Penaeus vannamei*). **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, p. 1-10, 13 maio 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.634152>.

MAJE, Mpho Defney; TCHATCHOUANG, Christ Donald Kaptchouang; MANGANYI, Madira Coutlyne; FRI, Justine; ATEBA, Collins Njie. Characterisation of *Vibrio* species from Surface and Drinking Water Sources and Assessment of Biocontrol Potentials of Their Bacteriophages. **International Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 2020, p. 1-15, 4 ago. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/8863370>.

MANILAL, Aseer; SUJITH, S.; SELVIN, Joseph; SHAKIR, Chippu; GANDHIMATHI, R.; KIRAN, G. Seghal. Virulence of Vibrios Isolated from Diseased Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*, Fabricius. **Journal Of The World Aquaculture Society**, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 332-343, 9 jun. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00375.x>.

MATAMP, Nandita; BHAT, Sarita G.. Phage Endolysins as Potential Antimicrobials against Multidrug Resistant *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*: current status of

research and challenges ahead. **Microorganisms**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 84, 18 mar. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms7030084>.

MITSUHASHI, Masato. Technical report: part 2. basic requirements for designing optimal pcr primers. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 285-293, 1996. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2825\(1996\)10:53.0.co;2-7](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1098-2825(1996)10:53.0.co;2-7).

MONIRI, Ahmad; RODRIGUEZ-MANZANO, Jesus; MALPARTIDA-CARDENAS, Kenny; YU, Ling-Shan; DIDELOT, Xavier; HOLMES, Alison; GEORGIOU, Pantelis. Framework for DNA Quantification and Outlier Detection Using Multidimensional Standard Curves. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 91, n. 11, p. 7426-7434, 6 maio 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01466>.

NAKAGAWA, Tatsuo; TANAKA, Junko; HARADA, Kunio; SHIRATORI, Akiko; SHIMAZAKI, Yuzuru; YOKOI, Takahide; UEMATSU, Chihiro; KOHARA, Yoshinobu. 10-Plex Digital Polymerase Chain Reaction with Four-Color Melting Curve Analysis for Simultaneous KRAS and BRAF Genotyping. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 92, n. 17, p. 11705-11713, 7 ago. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01704>.

NAVECA, Felipe Gomes; NASCIMENTO, Valdinete Alves do; SOUZA, Victor Costa de; NUNES, Bruno Tardelli Diniz; RODRIGUES, Daniela Sueli Guerreiro; VASCONCELOS, Pedro Fernando da Costa. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, [S.L.], v. 112, n. 7, p. 510-513, jul. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160062>.

NGUYEN, Phong L.; SUDHEESH, Ponnerassery S.; THOMAS, Austen C.; SINNESAEL, Mieke; HAMAN, Katherine; CAIN, Kenneth D.. Rapid Detection and Monitoring of Flavobacterium psychrophilum in Water by Using a Handheld, Field-Portable Quantitative PCR System. **Journal Of Aquatic Animal Health**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 302-311, 22 nov. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1002/aah.10046>.

NGUYEN, Phong L.; SUDHEESH, Ponnerassery S.; THOMAS, Austen C.; SINNESAEL, Mieke; HAMAN, Katherine; CAIN, Kenneth D.. Rapid Detection and Monitoring of Flavobacterium psychrophilum in Water by Using a Handheld, Field-Portable Quantitative PCR System. **Journal Of Aquatic Animal Health**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 302-311, 22 nov. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1002/aah.10046>.

NON-INVASIVE methods for assessing the welfare of farmed white-leg shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture Magazine**, [S.I.], 24 jul. 2023. Disponível em: <https://aquaculturemag.com/2023/07/24/non-invasive-methods-for-assessing-the-welfare-of-farmed-white-leg-shrimp-penaeus-vannamei/>. Acesso em: 2 jun. 2025.

NUNAN, Linda M.; PANTOJA, Carlos R.; GOMEZ-JIMENEZ, Silvia; LIGHTNER, Donald V.. “*Candidatus Hepatobacter penaei*,” an Intracellular Pathogenic Enteric Bacterium in the Hepatopancreas of the Marine Shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: decapoda). **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 79, n. 4, p. 1407-1409, 15 fev. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02425-12>.

OLIVE, D M. Detection of enterotoxigenic Escherichia coli after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. **Journal Of Clinical Microbiology**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 261-265, fev. 1989. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.27.2.261-265.1989>.

OLVEIRA, José G.; SOUTO, Sandra; BANDÍN, Isabel; DOPAZO, Carlos P.. Development and Validation of a SYBR Green Real Time PCR Protocol for Detection and Quantification of Nervous Necrosis Virus (NNV) Using Different Standards. **Animals**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 1100, 12 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ani11041100>.

PARK, Seong Bin; ZHANG, Yan. Development of Multienzyme Isothermal Rapid Amplification (MIRA) Combined with Lateral-Flow Dipstick (LFD) Assay to Detect Species-Specific tlh and Pathogenic trh and tdh Genes of *Vibrio parahaemolyticus*. **Pathogens**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 57, 6 jan. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens13010057>.

PEDRAZZANI, Ana Silvia; COZER, Nathieli; QUINTILIANO, Murilo Henrique; OSTRENSKY, Antonio. Insights into Decapod Sentience: applying the general welfare index (gwi) for whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei* ·boone, 1931) reared in aquaculture grow-out ponds. **Fishes**, [S.L.], v. 9, n. 11, p. 440, 29 out. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/fishes9110440>.

PENG, Min; CHEN, Xiuli; YANG, Chunling; LIU, Qingyun; LI, Qiangyong; ZHANG, Bin; WANG, Huanling; ZHU, Weilin; FENG, Pengfei; ZENG, Digang. A high-quality genome assembly of the Pacific white shrimp (*LitoPenaeus vannamei*) provides insights into its evolution and adaptation. **Aquaculture Reports**, [S.L.], v. 33, p. 101859, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101859>.

PEREIRA, Joana Carvalho; LEMOINE, Anja; NEUBAUER, Peter; JUNNE, Stefan. Perspectives for improving circular economy in brackish shrimp aquaculture. **Aquaculture Research**, [S.L.], v. 53, n. 4, p. 1169-1180, 26 nov. 2021. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/are.15685>.

PEREZ-ENRIQUEZ, Ricardo; JUÁREZ, Oscar e; GALINDO-TORRES, Pavel; VARGAS-AGUILAR, Ana Luisa; LLERA-HERRERA, Raúl. Improved genome assembly of the whiteleg shrimp Penaeus (*Litopenaeus*) vannamei using long- and short-read sequences from public databases. **Journal Of Heredity**, [S.L.], v. 115, n. 3, p. 302-310, 7 mar. 2024. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esae015>.

PETIT, Coraline; CAUDAL, Flore; TAUPIN, Laure; DUFOUR, Alain; KER, Carine Le; GIUDICELLI, Fanny; RODRIGUES, Sophie; BAZIRE, Alexis. Antibiofilm Activity of the Marine Probiotic Bacillus subtilis C3 Against the Aquaculture-Relevant Pathogen *Vibrio harveyi*. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 1551-1562, 8 fev. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-024-10229-z>.

PIRES, Nuno M. M.; DONG, Tao; YANG, Zhaochu; SILVA, Luís F. B. A. da. Recent methods and biosensors for foodborne pathogen detection in fish: progress and future prospects to sustainable aquaculture systems. **Critical Reviews In Food Science And**

Nutrition, [S.L.], v. 61, n. 11, p. 1852-1876, 15 jun. 2020. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2020.1767032>.

PRAJA, Rian Ka; SAFNURBAITI, Dwi Putri. The Infection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shrimp and Human. **Oceana Biomedicina Journal**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 44-58, 5 jan. 2018. Universitas Hang Tuah. <http://dx.doi.org/10.30649/obj.v1i1.6>.

RASMUSSEN, Bastian Barker; ERNER, Katrine Ege; BENTZON-TILIA, Mikkel; GRAM, Lone. Effect of TDA-producing Phaeobacter inhibens on the fish pathogen *Vibrio anguillarum* in non-axenic algae and copepod systems. **Microbial Biotechnology**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1070-1079, 6 maio 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.13275>.

REBOUÇAS, Rosa Helena; MENEZES, Francisca Gleire Rodrigues de; VIEIRA, Regine Helena Silva dos Fernandes; SOUSA, Oscarina Viana de. *Vibrio spp. como patógenos na carcinicultura: alternativas de controle*. Arquivos de Ciências do Mar, Fortaleza, v. 50, n. 1, p. 163–179, 2017.

REYES, Guillermo; BETANCOURT, Irma; ANDRADE, Betsy; PANCHANA, Fanny; ROMÁN, Rubén; SORROZA, Lita; TRUJILLO, Luis E.; BAYOT, Bonny. Microbiome of *Penaeus vannamei* Larvae and Potential Biomarkers Associated With High and Low Survival in Shrimp Hatchery Tanks Affected by Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 13, p. 1, 9 maio 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.838640>.

RODRÍGUEZ, Alicia; RODRÍGUEZ, Mar; CÓRDOBA, Juan J.; ANDRADE, María J.. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 31-56, 2015. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3

S, Ranjani; PARTHASARATHY, Pradeep; P, Rameshkumar; U, Vimalkumar; S, Hemalatha. Pungent anti-infective nanocolloids manipulate growth, biofilm formation, and CTX-M-15 gene expression in pathogens causing Vibriosis. *Aquaculture International*, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 859-869, 19 fev. 2021. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-021-00660-2>.

SAETANG, Jirakrit; SUKKAPAT, Phutthipong; PALAMAE, Suriya; SINGH, Prashant; SENATHIPATHI, Deep Nithun; BUATONG, Jirayu; BENJAKUL, Soottawat. Multiplex PCR-Lateral Flow Dipstick Method for Detection of Thermostable Direct Hemolysin (TDH) Producing *V. parahaemolyticus*. **Biosensors**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. 698, 30 jun. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/bios13070698>.

SAMSING, Francisca; BARNES, Andrew C.. The rise of the opportunists: what are the drivers of the increase in infectious diseases caused by environmental and commensal bacteria?. **Reviews In Aquaculture**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 1787-1797, maio 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12922>.

SÁNCHEZ-CARVAJAL, José María; GALÁN-RELAÑO, Ángela; RUEDAS-TORRES, Inés; JURADO-MARTOS, Francisco; LARENAS-MUÑOZ, Fernanda; VERA, Eduardo; GÓMEZ-GASCÓN, Lidia; CARDOSO-TOSET, Fernando; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, Irene Magdalena; MALDONADO, Alfonso. Real-Time PCR Validation for Mycobacterium

tuberculosis Complex Detection Targeting IS6110 Directly From Bovine Lymph Nodes. **Frontiers In Veterinary Science**, [S.L.], v. 8, p. 1, 26 abr. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2021.643111>.

SANTOS, Harvey M.; TSAI, Ching-Yi; MAQUILING, Kent Roger A.; TAYO, Lemuel L.; MARIATULQABTIAH, Abdul R.; LEE, Chi-Wen; CHUANG, Kuo Pin. Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. **Aquaculture International**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 169-185, 10 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-019-00451-w>

SCHOCHELMAN, G.; OU, C.-Y.; JONES, W. K.. Polymerase Chain Reaction. **Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 158, n. 6, p. 1154-1157, 1 dez. 1988. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/158.6.1154>.

SHAHIN, Khalid; MUKKATIRA, Kaveramma; YAZDI, Zeinab; RICHEY, Christine; KWAK, Kevin; HECKMAN, Taylor I.; MOHAMMED, Haitham H.; ORTEGA, Cesar; AVENDAÑO-HERRERA, Ruben; KELEHER, Bill. Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of the aetiological agents of piscine lactococcosis. **Journal Of Fish Diseases**, [S.L.], v. 45, n. 6, p. 847-859, 20 mar. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.13610>.

SHAHIN, Khalid; MUKKATIRA, Kaveramma; YAZDI, Zeinab; RICHEY, Christine; KWAK, Kevin; HECKMAN, Taylor I.; MOHAMMED, Haitham H.; ORTEGA, Cesar; AVENDAÑO-HERRERA, Ruben; KELEHER, Bill. Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of the aetiological agents of piscine lactococcosis. **Journal Of Fish Diseases**, [S.L.], v. 45, n. 6, p. 847-859, 20 mar. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.13610>.

SHAHRAJABIAN, Mohamad Hesam; SUN, Wenli. The Significance and Importance of dPCR, qPCR, and SYBR Green PCR Kit in the Detection of Numerous Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 169-179, jan. 2024. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/0113816128276560231218090436>.

SHEAHAN, Megan; GOULD, Caitlin A.; NEUMANN, James E.; KINNEY, Patrick L.; HOFFMANN, Sandra; FANT, Charles; WANG, Xinyue; KOLIAN, Michael. Examining the Relationship between Climate Change and Vibriosis in the United States: projected health and economic impacts for the 21st century. **Environmental Health Perspectives**, [S.L.], v. 130, n. 8, p. 1, ago. 2022. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp9999a>.

SIDDIQUE, Abu Baker; MONIRUZZAMAN, M.; ALI, Sobur; DEWAN, Md. Nayem; ISLAM, Mohammad Rafiqul; ISLAM, Md. Shafiqul; AMIN, Mohammed Badrul; MONDAL, Dinesh; PARVEZ, Anowar Khasru; MAHMUD, Zahid Hayat. Characterization of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Isolated From Fish Aquaculture of the Southwest Coastal Area of Bangladesh. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 12, p. 1, 8 mar. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.635539>.

SILVA, Evelyn Cristine da; OLIVEIRA, Catarina Demarchi de; RIBEIRO, Lucas Franco Miranda; CASAS, Monique Ribeiro Tiba; PEREIRA, Juliano Gonçalves; POSSEBON, Fábio Sossai; ARAÚJO JUNIOR, João Pessoa. Salmonella detection with LAMP and qPCR and identification of serovars of interest by multiplex qPCR in poultry carcasses. **Brazilian**

Journal Of Microbiology, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 2173-2182, 16 ago. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-023-01095-y>.

SINGH, Amarjeet; PANDEY, Girdhar K.. Primer Design Using Primer Express® for SYBR Green-Based Quantitative PCR. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 153-164, 2015. Springer New York.

SOLER, Marina Martínez; SHIN, Hyun Suk; LORENZO-FELIPE, Álvaro; SERRANO, María Jesús Zamorano; CASTRO, Pedro Luis; MESA, Laura Cristina Pachón; RODRÍGUEZ, Jenny Antonia; TOMALÁ, Cecilia; SONNENHOLZNER, Stanislaus; CARVALHEIRO, Roberto. Genetic parameters of resistance to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) caused by *Vibrio parahaemolyticus* and their genetic correlations with growth traits in an Ecuadorian *Penaeus vannamei* population. **Aquaculture**, [S.L.], v. 604, p. 742458, jun. 2025. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2025.742458>.

SREEJITH, Kamalayam Rajan; GORGANNEZHAD, Lena; JIN, Jing; OOI, Chin Hong; STRATTION, Helen; DAO, Dzung Viet; NGUYEN, Nam-Trung. Liquid marbles as biochemical reactors for the polymerase chain reaction. **Lab On A Chip**, [S.L.], v. 19, n. 19, p. 3220-3227, 2019. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c9lc00676a>.

STILWELL, Nk; WHITTINGTON, Rj; HICK, Pm; BECKER, Ja; ARIEL, E; VAN BEURDEN, S; VENDRAMIN, N; OLESEN, Nj; WALTZEK, Tb. Partial validation of a TaqMan real-time quantitative PCR for the detection of ranaviruses. **Diseases Of Aquatic Organisms**, [S.L.], v. 128, n. 2, p. 105-116, 7 maio 2018. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/dao03214>.

SUN, Mingzhe; YU, Yang; LI, Shihao; LIU, Yuan; ZHANG, Xiaojun; LI, Fuhua. Integrated application of transcriptomics and metabolomics provides insights into acute hepatopancreatic necrosis disease resistance of Pacific white shrimp *LitoPenaeus vannamei*. **Msystems**, [S.L.], 26 jun. 2023. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/msystems.00067-23>.

TANG, Hui; CAI, Qingchun; LI, Hu; HU, Peng. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantification of hepatitis B virus DNA. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [S.L.], v. 80, n. 11, p. 2159-2164, 1 nov. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2016.1196576>.

TENG, Fei; NAIR, Sree Sankar Darveekaran; ZHU, Pengfei; LI, Shanshan; HUANG, Shi; LI, Xiaolan; XU, Jian; YANG, Fang. Impact of DNA extraction method and targeted 16S-rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1, 5 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-34294-x>.

THOMPSON, Janelle R.; RANDA, Mark A.; MARCELINO, Luisa A.; TOMITA-MITCHELL, Aoy; LIM, Eelin; POLZ, Martin F.. Diversity and Dynamics of a North Atlantic Coastal *Vibrio* Community. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 70, n. 7, p. 4103-4110, jul. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.7.4103-4110.2004>.

THOMPSON, John; WEAVER, Mark A.; LUPATSCH, Ingrid; SHIELDS, Robin J.; PLUMMER, Sue; COATES, Christopher J.; ROWLEY, Andrew F.. Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria Against Pathogenic Vibrios and Their Potential Use as Probiotics in Shrimp (*Penaeus vannamei*) Culture. **Frontiers In Marine Science**, [S.L.], v. 9, p. 1, 28 fev. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2022.807989>.

TORRES-CORRAL, Yolanda; SANTOS, Ysabel. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Streptococcus iniae* using the lactate permease gene. **Journal Of Fish Diseases**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 53-61, 21 set. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.13267>.

TRAN, Phuong Thi Ngoc; KUMAR, Vikash; BOSSIER, Peter. Do acute hepatopancreatic necrosis disease-causing PirAB VP toxins aggravate Vibriosis? **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1919-1932, jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2020.1811778>.

TSUGANE, Mamiko; SUZUKI, Hiroaki. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in Giant Unilamellar Vesicles. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1, 15 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-27547-2>.

UNTERGASSER, Andreas; RUIJTER, Jan M.; BENES, Vladimir; HOFF, Maurice J. B. van Den. Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (rt)-qpcr amplification and melting data. **Bmc Bioinformatics**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1, 24 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-021-04306-1>.

VALDERRAMA, Diego et al. The Economic Impacts of Emerging Diseases in Shrimp Aquaculture. In: North American Association of Fisheries Economists, 2017, La Paz. Palestra... La Paz: NAAFE Forum, 2017.

VALENTE, Cecília de Souza; WAN, Alex H.L.. *Vibrio* and major commercially important Vibriosis diseases in decapod crustaceans. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [S.L.], v. 181, p. 107527, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2020.107527>.

VALENTE, Cecilia de Souza; WAN, Alex H.L.. *Vibrio* and major commercially important Vibriosis diseases in decapod crustaceans. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [S.L.], v. 181, p. 107527, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2020.107527>.

WAN, Zhenzhou; ZHANG, Ya'nan; HE, Zhixiang; LIU, Jia; LAN, Ke; HU, Yihong; ZHANG, Chiyu. A Melting Curve-Based Multiplex RT-qPCR Assay for Simultaneous Detection of Four Human Coronaviruses. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 17, n. 11, p. 1880, 23 nov. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17111880>.

WANG, Dongdong; LI, Jiahui; ZHU, Guoliang; ZHAO, Kun; JIANG, Wenwen; LI, Haidong; WANG, Wenjun; KUMAR, Vikash; DONG, Shuanglin; ZHU, Weiming. Mechanism of the Potential Therapeutic Candidate *Bacillus subtilis* BSXE-1601 Against Shrimp Pathogenic Vibrios and Multifunctional Metabolites Biosynthetic Capability of the Strain as Predicted by Genome Analysis. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1, 26 out. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.581802>.

WANG, Zhongyan; AWEYA, Jude Juventus; YAO, Defu; ZHENG, Zhihong; WANG, Chuanqi; ZHAO, Yongzhen; LI, Shengkang; ZHANG, Yueming. Taurine metabolism is modulated in *Vibrio*-infected *Penaeus vannamei* to shape shrimp antibacterial response and survival. **Microbiome**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-19, 5 dez. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-022-01414-9>.

WEAR, Emma K.; WILBANKS, Elizabeth G.; NELSON, Craig E.; CARLSON, Craig A.. Primer selection impacts specific population abundances but not community dynamics in a monthly time-series 16S rRNA gene amplicon analysis of coastal marine bacterioplankton. **Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 2709-2726, 6 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.14091>.

XING, Yuenan; CHEN, Ye; FENG, Chengcheng; BAO, Jie; LI, Xiaodong; JIANG, Hongbo. Establishment and Application of Real-Time Fluorescence Quantitative PCR Detection Technology for *Metschnikowia bicuspidata* Disease in *Eriocheir sinensis*. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 9, n. 8, p. 791, 27 jul. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof9080791>.

XU, Deshun; JI, Lei; WU, Xiaofang; YAN, Wei; CHEN, Liping. Detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* by multiplexed real-time PCR. **Canadian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 64, n. 11, p. 809-815, nov. 2018. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/cjm-2018-0083>.

XU, Yajin; SUN, Jun; HU, Jingjie; BAO, Zhenmin; WANG, Mengqiang. Characterization and Preliminary Application of a Novel Lytic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophage vB_VpaP_SJSY21. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 24, p. 17529, 15 dez. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms242417529>.

YANG, Xiaohan; ZHANG, Xue; WANG, Yu; SHEN, Hui; JIANG, Ge; DONG, Jingquan; ZHAO, Panpan; GAO, Song. A Real-Time Recombinase Polymerase Amplification Method for Rapid Detection of *Vibrio vulnificus* in Seafood. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1, 6 nov. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.586981>.

YANG, Xiaohan; ZHAO, Panpan; DONG, Yu; SHEN, Xin; SHEN, Hui; LI, Juan; JIANG, Ge; WANG, Weiling; DAI, Hong; DONG, Jingquan. An improved recombinase polymerase amplification assay for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* with lateral flow strips. **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 85, n. 6, p. 1834-1844, 25 maio 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.15105>.

ZAZZI, Maurizio; ROMANO, Laura; BRASINE, Agostina; VALENSIN, Pier Egisto. Simultaneous Amplification of Multiple HIV-1 DNA Sequences from Clinical Specimens by Using Nested-Primer Polymerase Chain Reaction. **Aids Research And Human Retroviruses**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 315-320, abr. 1993. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/aid.1993.9.315>.

ZHANG, Haoqing; YAN, Zhiqiang; WANG, Xinlu; GAĽOVÁ, Martina; CHANG, Honglong; LAĽÁKOVÁ, Soňa; KORABECNÁ, Marie; NEUZIL, Pavel. Determination of Advantages and Limitations of qPCR Duplexing in a Single Fluorescent Channel. **Acs Omega**, [S.L.], v. 6, n. 34, p. 22292-22300, 19 ago. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.1c02971>.

ZHANG, Xiao-Hua; HE, Xinxin; AUSTIN, Brian. *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. **Marine Life Science & Technology**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 231-245, 3 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s42995-020-00037-z>.