



CARLOS AUGUSTO GOMES LEAL

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE
PROTOCOLOS DE PCR EM TEMPO REAL
PARA O DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS
EMERGENTES PARA AQUICULTURA
NACIONAL**

LAVRAS - MG

2012

CARLOS AUGUSTO GOMES LEAL

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE PCR
EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS
EMERGENTES PARA AQUICULTURA NACIONAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade de Animais Aquáticos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

LAVRAS - MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Leal, Carlos Augusto Gomes.

Desenvolvimento e otimização de protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico de patógenos emergentes para a aquicultura nacional / Carlos Augusto Gomes Leal. – Lavras: UFLA, 2011.

92 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Henrique Cear Pereira Figueiredo.

Bibliografia.

1. Aquicultura. 2. Diagnóstico. 3. Doenças infecciosas. 4. PCR em tempo real. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 639.8

CARLOS AUGUSTO GOMES LEAL

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE PCR
EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DE PATÓGENOS
EMERGENTES PARA AQUICULTURA NACIONAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade de Animais Aquáticos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de dezembro de 2011.

Dra. Gláucia Frasnelli Mian	UFLA
Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA
Dr. Rômulo Cerqueira Leite	UFMG
Dr. Thales Passos de Andrade	UEMA

Dr. Henrique César Pereira Figueiredo
Orientador

LAVRAS – MG

2011

*A Deus, pela vida. A minha esposa, Franciene e aos meus filhos, Laura e Arthur,
pelo amor, apoio e felicidade que me propõem.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária, por oferecerem o Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, concedendo-me a oportunidade de realizar o doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto.

Aos meus pais, José Carlos e Regina, grandes responsáveis pela pessoa que me tornei e a quem devo eterna gratidão. Aos meus irmãos e “amigos” que me acompanham desde os primeiros passos, intuindo e amparando.

Ao professor Henrique Figueiredo, pela orientação, oportunidade e pelos ensinamentos que contribuem para a minha formação profissional.

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite, pelo imensurável auxílio durante a condução dos experimentos e ensinamentos.

Aos colegas de trabalho do Laboratório Aquavet, Frederico e Gleí, pela colaboração na condução dos experimentos.

À Escola de Veterinária da UFMG, especialmente ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, por ter me recebido e fornecido as condições para a realização dos experimentos.

RESUMO

A ocorrência de surtos de doenças infecciosas tem se caracterizado como um dos principais entraves para a aquicultura nacional. Dentre os patógenos emergentes destacam-se os vírus WSSV e IHHNV, para carcinicultura e as bactérias do gênero *Streptococcus*, para tilapicultura. O diagnóstico rápido, acurado e sensível desses agentes é fundamental para os programas de controle, sendo a PCR em tempo real (qPCR) uma técnica que satisfaz essas premissas. O presente projeto foi realizado com os objetivos de: padronizar e otimizar protocolos qPCR com sondas de hidrólise, contendo “quencher” não fluorescente, para a detecção dos vírus WSSV e IHHNV; desenvolver uma qPCR duplex para a detecção de casos de coinfeção pelos vírus WSSV e IHHNV em camarão cultivado (*Litopenaeus vannamei*) e desenvolver uma qPCR duplex para o diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* patogênicos para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). As sondas de hidrólise contendo “quencher” não fluorescente aumentaram significativamente a sensibilidade clínica da qPCR para o diagnóstico de WSSV. O diagnóstico de casos de coinfeção pelos vírus WSSV e IHHNV foi realizado com sucesso com o uso da qPCR duplex. A qPCR duplex desenvolvida para o diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* apresentou maior sensibilidade clínica que métodos microbiológicos e PCR. O uso da qPCR mostrou-se viável e com resultados superiores aos das demais técnicas utilizadas. As reações descritas no presente trabalho são uma alternativa valiosa para o diagnóstico de patógenos emergentes para a aquicultura nacional.

Palavras-chave: Aquicultura. Diagnóstico. Doenças infecciosas. PCR em tempo real.

ABSTRACT

Outbreaks of infectious diseases are one of the main problems for national aquaculture development. The WSSV and IHHNV viruses, and streptococcal agents have been considered emergent pathogens for Brazilian shrimp, and tilapia farming, respectively. Fast, accurate and sensible diagnostic tools are fundamental for the control of diseases and biosecurity programs. The real-time PCR is a technology which has those characteristics, being an alternative. The aims of this project were: to standard and optimize qPCR assays with hydrolyze probes, containing non fluorescent quencher, for detection of WSSV and IHHNV; to develop a duplex qPCR to detect co-infection cases of WSSV and IHHNV in cultivated whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*); and to develop a duplex qPCR to diagnose *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus dysgalactiae* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The use of non fluorescent quenched probe improved significantly the clinical sensitivity of qPCR for WSSV detection. WSSV and IHHNV co-infection cases were successfully diagnosed with the duplex qPCR standardized. The developed duplex qPCR for *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* diagnosis presented higher clinical sensitivity than bacteriological assay and PCR. qPCR showed superior performances than other methods used to diagnose those pathogens. The qPCR assays described in the present work showed to be valuable alternatives to diagnose the emergent pathogens for Brazilian aquaculture.

Keywords: Aquaculture. Diagnosis. Infectious Diseases. Real-time PCR.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Aquicultura	12
2.1.1	Carcinicultura	12
2.1.2	Piscicultura	14
2.2	Patógenos emergentes para a aquicultura nacional	15
2.2.1	Doenças virais de importância para carcinicultura	15
2.2.1.1	Doença da mancha branca	16
2.2.1.2	Necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa	20
2.2.2	Estreptococoses em peixes	23
2.2.2.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	26
2.2.2.1	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	29
2.3	Diagnóstico de doenças infecciosas em animais aquáticos	31
2.3.1	PCR em tempo real	31
2.3.2	Diagnóstico de doenças virais de camarão	34
2.3.3	Diagnóstico das estreptococoses	35
3	CONCLUSÕES	38
	REFERÊNCIAS	39
	SEGUNDA PARTE-ARTIGOS	47
	ARTIGO 1 Comparative analysis of conventional PCR and real-time PCR to diagnose shrimp WSD	47
	ARTIGO 2 Duplex real-time PCR for detection of WSSV and IHNV infections in cultivated shrimp	59
	ARTIGO 3 Development of real-time PCR for the diagnosis of fish pathogenic <i>S. agalactiae</i> and <i>S. dysgalactiae</i>	73

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Com incremento significativo nas últimas décadas, a aquicultura é um dos ramos mais promissores da agropecuária, no que tange à produção de proteína de origem animal. Seguindo a tendência mundial, o Brasil vem apresentando taxas elevadas de expansão da atividade, propiciadas, em grande parte, pela intensificação do cultivo. Contudo, as altas densidades de estocagem e manejo intenso adotados nesses sistemas de produção reduzem a imunidade dos animais e permitem a manutenção e a rápida disseminação de patógenos. Esses fatores de risco criam condições favoráveis para a ocorrência de surtos de doenças infecciosas. Conseqüentemente, os problemas sanitários são considerados, atualmente, o principal entrave para o pleno desenvolvimento da aquicultura mundial.

O camarão marinho e as tilápias são as commodities aquícolas de maior importância econômica no país. Estudos prospectivos e dados oficiais demonstram que a ocorrência de surtos de doenças virais tem se apresentado como principal problema sanitário para a carcinicultura nacional. Dentre os agentes etiológicos de viroses em crustáceos se destacam o vírus da mancha-branca (WSSV), o vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa (IHHNV) e o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). Já para a tilapicultura, os surtos de estreptococose são responsáveis por grandes prejuízos e impactam essa cadeia produtiva de maneira significativa todos os anos.

Streptococcus agalactiae e *Streptococcus dysgalactiae* são bactérias frequentemente associadas a casos de mortalidade em fazendas de tilápia, consideradas patógenos emergentes para a piscicultura brasileira.

Para programas e procedimentos de controle e prevenção de doenças infecciosas na aquicultura, o diagnóstico das enfermidades é uma etapa fundamental para o sucesso desses. Os métodos utilizados para a detecção dos patógenos devem atender a premissas básicas, como possuir alta sensibilidade, alta especificidade, ser rápido e ter custo acessível. As técnicas de PCR em tempo real se apresentam como uma alternativa promissora para esses fins. Como principais vantagens dessa técnica destacam-se maior sensibilidade, celeridade no processo e permitir a avaliação quantitativa das cargas infectantes. A utilização dessa tecnologia para o diagnóstico de doenças em seres humanos e animais (terrestres e aquáticos) tem crescido expressivamente nos últimos anos.

A aplicação crescente da PCR em tempo real para o diagnóstico de doenças infecciosas tem sido fomentada, em parte, pelo desenvolvimento recente de novas químicas e equipamentos. Essas tecnologias têm propiciado um aumento significativo na sensibilidade analítica e clínica das reações, além de contribuir para a redução nos custos das análises, devido à concorrência entre as diferentes empresas e suas tecnologias. Entretanto, a validação dos novos métodos e a avaliação da performance de reações previamente desenvolvidas, com reagentes e aparelhos mais modernos, prescindem a realização de estudos científicos, como os apresentados na presente tese.

Adicionalmente, uma característica que torna a PCR em tempo real uma ferramenta diagnóstica vantajosa em relação à PCR convencional é a não necessidade de procedimentos pós-reação ou de revelação. Isso torna o diagnóstico menos laborioso e com menor capacidade de falhas operacionais humanas. Além disso, incrementa a capacidade de analítica dos laboratórios para realização de exames em larga escala, pois menor estrutura física e recursos humanos são necessários. Esse conjunto de características é especialmente importante para os programas de controle e erradicação de doenças. Nesses programas, a quantidade de testes realizados é elevada, requerendo, assim, uma

grande capacidade de processamento instalada nos laboratórios oficiais. Com a aplicação de tecnologias de PCR em tempo real, as unidades diagnósticas podem atender à demanda de maneira eficaz, evitando sua sobrecarga operacional.

Além das demandas supracitadas, os programas requerem que os resultados sejam disponibilizados rapidamente e que os métodos diagnósticos tenham a capacidade de detectar os patógenos em formas jovens e commodities. A introdução de enfermidades nas propriedades via entrada de pós-larvas e alevinos é um ponto crítico e tem sido um dos principais entraves para a eficiência dos programas de controle, assim como a importação de commodities infectadas põe em risco as populações nativas e cultivadas de animais aquáticos, pois podem ser portadores de patógenos exóticos. Atualmente, a maioria das ferramentas utilizadas para o diagnóstico de doenças infecciosas em animais aquáticos tem baixa ou nenhuma capacidade de realização nos espécimes citados. A PCR em tempo real, de acordo com suas características já descritas, pode ser uma alternativa para essas situações.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos: 1) padronizar e otimizar reações de PCR em tempo real com sondas de hidrólise, contendo “quencher” não fluorescente, para a detecção dos vírus WSSV e IHHNV; 2) desenvolver uma reação de PCR em tempo real para o diagnóstico simultâneo e de casos de coinfeção pelos vírus WSSV e IHHNV em amostras clínicas de camarão cultivado (*Litopenaeus vannamei*); 3) desenvolver reações de PCR em tempo real, simples e “duplex”, para o diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* patogênicos para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Os resultados são apresentados na segunda parte da tese e em forma de artigo científico (três artigos), redigidos de acordo com as normas dos periódicos científicos para os quais foram ou serão submetidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aquicultura

A aquicultura é o ramo da agropecuária que mais cresceu, com uma evolução na produção total de menos de um milhão de toneladas, nos anos 1950, para aproximadamente 56 milhões de toneladas, em 2008 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2010). De acordo com a FAO (2010), a aquicultura já atende a 46% da demanda mundial por peixes e outros organismos aquáticos, sendo, ainda, satisfatoriamente capaz de atender à crescente procura por esse tipo de alimento.

Nas últimas décadas houve um incremento significativo na produção aquícola em todo o mundo, com crescimento médio de 8,8%. Nesse período, a América Latina e o Caribe se destacaram, com expansão média de 21,3%. O Brasil detém a terceira maior produção aquícola da América Latina, sendo expoente na produção de camarões e tilápias. O consumo *per capita* de pescado *in natura* no Brasil é pequeno (9,03 kg/hab/ ano) em relação ao de outros países do mundo, como, por exemplo, nos países asiáticos (18,5 kg/hab/ano) (FAO, 2010). Somente cerca de 10% da população utiliza o pescado em sua alimentação (BRASIL, 2010).

2.1.1 Carcinicultura

No Brasil, a carcinicultura teve início nos anos 1980, mas somente a partir do final da década de 1990, com a introdução da espécie de camarão *Litopenaeus vannamei*, o setor obteve incremento significativo na produção. Essa espécie apresenta características zootécnicas favoráveis e é mais adaptada ao cultivo, principalmente em condições comerciais (ASSOCIAÇÃO

BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO - ABCC, 2010). De acordo com dados oficiais (BRASIL, 2010), a produção brasileira de camarão totalizou 70 mil toneladas, nos anos de 2008 e 2009, sendo Rio Grande do Norte, Ceará e Santa Catarina os principais estados produtores. No ano de 2010, estimativas feitas pelo setor produtivo eram de 80 mil toneladas, com tendência de elevação na produção (ABCC, 2010).

Após um crescimento exponencial médio de mais de 50% ao ano desde 1998, a carcinicultura brasileira registrou forte crise a partir de 2004. Em relação ao ano de 2003, houve queda de 15,84% na produção, com decréscimo no montante produzido de 90.190 para 75.904 toneladas. A produtividade foi reduzida de 6.084 kg/ha/ano para 4.573 kg/ha/ano. No ano seguinte, a produção continuou a cair, até se estabilizar em 65.000 toneladas, em 2006 e 2007 (ABCC, 2010).

A crise na atividade foi ocasionada por problemas cambiais e surtos de doenças infecciosas. No ápice da expansão carcinícola, em 2003, as propriedades nacionais adotavam as maiores densidades de estocagem e tinham as maiores produtividades do mundo. Porém, havia um despreparo dos produtores quanto às práticas de manejo sanitário e de biossegurança para a prevenção de doenças. Além disso, o órgão nacional e as agências estaduais de defesa sanitária animal não tinham estrutura para a realização de diagnóstico oficial. Nesse ambiente, as doenças virais começaram a surgir e a impactar a produção. Como não havia diagnóstico, o problema se disseminou rapidamente pelas principais regiões produtoras (ABCC, 2010). Essas doenças ocorreram de forma emergente em vários países produtores, em diferentes continentes. Apesar das características regionais da produção, a ocorrência contemporânea denota os despreparo da cadeia produtiva do camarão nos assuntos sanitários, sua importância e o papel fundamental do diagnóstico como forma de proteção da produção mundial.

2.1.2 Piscicultura

A piscicultura nacional apresenta-se em processo de franco desenvolvimento e expansão, com diferentes espécies sendo cultivadas nos país. Apesar da exploração comercial crescente de espécies nativas, a criação de tilápias responde atualmente por 39% do total produzido (BRASIL, 2010). De acordo com o último levantamento da FAO, o Brasil é o 7º maior produtor mundial de tilápias (FAO, 2010). O cultivo desse peixe em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais, apresentou crescimento médio anual de 11,5% no século passado, com produção bruta inferior apenas à de carpas e salmonídeos (EL-SAYED, 1999). A indústria brasileira de tilápia cresce vigorosamente, com posição de destaque entre os países americanos. Condições climáticas favoráveis e vastos reservatórios hídricos corroboram para a expansão significativa da produção nacional (FITZSIMMONS, 2000).

A produção brasileira de tilápia atingiu, no de 2009, o montante de 132 mil toneladas, sendo o Ceará o principal estado produtor (BRASIL, 2010). Estima-se que, caso 2% do potencial hídrico do país fosse utilizado para o cultivo de peixes em tanques-rede, o Brasil estaria entre os maiores produtores mundiais de peixe. O estabelecimento da cadeia produtiva da tilápia pode propiciar o desenvolvimento de agroindústrias de processamento, além de geração de milhares de empregos, maior produção de alimentos, geração de renda e intercâmbio de tecnologias, incrementando o agronegócio nacional (VERA-CALDERON; FERREIRA, 2004). Nesse contexto, o licenciamento dos parques aquícolas tem contribuído para a expansão da atividade e a exploração do potencial latente no país.

Atualmente, estão demarcados seis reservatórios, com 42 parques e capacidade de produção de aproximadamente 270 mil toneladas/ ano. Com a demarcação de mais 25 reservatórios nos próximos anos, essa capacidade poderá

atingir volume anual de 564 mil toneladas. Estimativas da FAO sugerem que, em 2030, o Brasil pode se tornar um dos maiores produtores de pescado do mundo, com produção de 20 milhões de toneladas/ano (BRASIL, 2010).

A produção nacional de peixes é fortemente baseada no cultivo de espécies exóticas, com mercado de commodities estabelecido e pacotes tecnológicos definidos. Porém, o Brasil tem ampla diversidade de espécies nativas com potencial para aquicultura, algumas delas sendo exploradas comercialmente com sucesso nos últimos anos. Dentre estas pode se destacar a produção de tambaqui (*Colossoma macropomum*), principalmente na região norte do país (FAO, 2008), que apresentou um crescimento significativo nos últimos anos, com volume produzido, em 2009, de 46.454 toneladas. Além desta, os cultivos de pintado (*Pseudoplatistoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatistoma fasciatum*) e seus híbridos têm apresentado uma expansão considerável, em diversas regiões do país. Contudo, a quantidade anual produzida é significativamente inferior à de tilápias e tambaqui (BRASIL, 2010). Adicionalmente, outras espécies de água doce e marinhas têm sido testadas para a produção aquícola, porém, os cultivos estão ainda em fases de desenvolvimento.

2.2 Patógenos emergentes para a aquicultura nacional

2.2.1 Doenças virais de importância para carcinicultura

As doenças virais são o principal problema sanitário para a carcinicultura mundial, sendo responsáveis por bilhões de dólares em prejuízos todos os anos. Além disso, sua ocorrência tem sido considerada a principal causa de insucesso da atividade em diversas regiões produtoras ao redor mundo (LIGHTNER, 2011; LIGHTNER et al., 1997). Atualmente, não existem

tratamentos eficientes para enfermidades virais em camarão (LIGHTNER, 2011; OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES - OIE, 2010). Esse fato, associado ao grande impacto ocasionado pelos surtos e dispersão global dos patógenos, levou a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) a incluir a maioria das viroses de camarão na lista de doenças de notificação obrigatória de crustáceos. Atualmente, essa lista é composta por oito doenças, das quais sete são de etiologia viral (OIE, 2010).

No Brasil, dentre os fatores que contribuíram para a crise na carcinicultura nos últimos anos estão a ocorrência de surtos da doença da mancha-branca e da mionecrose infecciosa, nas principais regiões produtoras do país (Santa Catarina e estados do Nordeste) (ABCC, 2010). Adicionalmente, infecções causadas pelo vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa têm sido reportadas frequentemente. Apesar de não ocasionar grandes mortalidades, esse vírus reduz bruscamente a produtividade do plantel (TEIXEIRA-LOPES et al., 2011). Altamente impactantes e de difícil controle e erradicação, essas enfermidades, uma vez introduzidas no plantel, reduzem bruscamente a produtividade e a eficiência econômica das fazendas (OIE, 2010). Além disso, sua ocorrência compromete a comercialização dos animais e seus produtos devido às restrições comerciais impostas por problemas sanitários. Isso decorre da possibilidade de introdução dos vírus em regiões livres, via água onde foram acondicionados ou, ainda, descarte incorreto de restos e sobras de animais ou produtos no país importador (LIGHTNER et al., 1997).

2.2.1.1 Doença da mancha-branca

A doença da mancha-branca (*white spot disease*, ou WSD) é uma enfermidade aguda, causada por um vírus de mesmo nome (*White spot shrimp virus*, WSSV). O WSSV é um DNA vírus, de fita dupla, envelopado, de formato

baciliforme com densidade aproximada de 1,2 g/mL. O genoma desse agente tem tamanho variado, com amostras isoladas da China, Tailândia e Taiwan apresentando 305.107 pb (número de acesso GenBank AF332093), 292.967 pb (AF369029) e 307.287 pb (AF440570), respectivamente (LIGHTNER, 2011). Os vírions envelopados apresentam dimensões da ordem de 210 a 380 nm de comprimento e 70 a 167 nm de largura. Esse agente possui um apêndice em uma das extremidades, que pode ser visualizado na microscopia eletrônica de transmissão. O envelope viral apresenta espessura de 6 a 7 nm, com conformação de membrana trilaminar, com duas camadas pouco eletrodensas, divididas por uma camada de alta densidade eletrônica. O nucleocapsídeo é composto por subunidades de proteína globular de 10 nm de diâmetro, arranjadas em 14 ou 15 estriações verticais, localizadas a cada 22 nm ao longo da estrutura. Mais de quarenta proteínas desse agente já foram descritas. Além das proteínas estruturais, outras não estruturais, provavelmente associadas à regulação transcricional (VP9), multiplicação viral e replicação do DNA (WSV447), mostram-se essenciais para a infecção. Os vírions são gerados no núcleo hipertrofiado das células infectadas, na ausência de corpúsculo de inclusão (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008).

O WSSV foi recentemente incluído, pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), em um novo gênero, o *Whispovirus*, pertencente à família *Nimaviridae* (LIGHTNER, 2011). Esse patógeno apresenta ampla gama de hospedeiros susceptíveis, com descrições da infecção em 18 espécies de camarões, cultivados e de vida livre. Além desses, o WSSV já foi detectado em 14 espécies de lagosta, 38 de caranguejo, 6 crustáceos não decápodes, membros dos gêneros *Chaetognata* e *Rotifera*, poliquetas e larvas de insetos aquáticos. Apesar do significativo número de espécies, nem todos os organismos supracitados albergam infecções virais ativas, não sendo verificados indícios de replicação viral em muitos casos (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008).

Todas as espécies de peneídeos cultivadas comercialmente são susceptíveis à infecção por WSSV. A doença acomete desde pós-larvas maduras até animais adultos, ocasionando surtos com altas taxas de mortalidade. Os sinais clínicos são verificados de 14 a 40 dias pós-povoamento (OIDTMANN; STENTIFORD, 2011). A evolução desses é extremamente rápida, com mortalidades de até 100% verificadas 3 a 10 dias após o início da enfermidade. Esse tipo de infecção devastadora ocorre principalmente na introdução do vírus em fazendas livres (LIGHTNER, 2011).

As manchas brancas, que caracterizam e dão nome à doença, são o principal sinal clínico verificado em *Litopenaeus vannamei* acometidos pelo WSSV. Essas são caracteristicamente observadas na região interna do exoesqueleto, mas podem se distribuir por todo o corpo do camarão. A patogênese dessa lesão peculiar ainda não se apresenta totalmente esclarecida, porém, a deposição anormal de sais de cálcio é a responsável por sua aparência macroscópica. Em animais com infecção aguda por WSSV, quadros abruptos de anorexia, letargia e perda do exoesqueleto são comumente observados. Estes, em geral, precedem o aparecimento das mortalidades e das manchas-brancas. Na avaliação histopatológica, a principal alteração verificada nas preparações de rotina é a presença de um proeminente corpúsculo de inclusão (com coloração eosinofílica a basofílica fraca; coloração Feulgen positiva), no interior dos núcleos hipertrofiados. Tais alterações são comumente observadas nas células do epitélio cuticular, do tecido conjuntivo e do epitélio da glândula antenal (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008; LIGHTNER, 2011).

Nas fazendas, os principais fatores de risco para a ocorrência dos surtos são mudanças bruscas na salinidade e temperatura da água, bem como outros problemas de qualidade de água (OIDTMANN; STENTIFORD, 2011). A temperatura é um fator particularmente determinante para a severidade da doença em *L. vannamei*. Em condições experimentais, a elevação da temperatura

acima de 32 °C promove uma abrupta inibição na multiplicação viral. Contudo, a 25 °C, a letalidade da enfermidade atinge 100%. Esse fenômeno fornece subsídios para explicar as variações sazonais na ocorrência da doença, sendo mais comumente verificada em épocas mais frias do ano (LIGHTNER, 2011). Tal inferência pode justificar as diferenças na epidemiologia e na severidade da infecção em distintas regiões do Brasil. Atualmente, sabe-se que o vírus está presente em fazendas em Santa Catarina e na região nordeste (BRASIL, 2011). Porém, sua manifestação é mais impactante no estado do sul, provavelmente devido à menor temperatura em determinados períodos do ano.

A WSD foi descrita e caracterizada pela primeira vez em 1992-1993. O WSSV foi identificado a partir de um surto em uma fazenda de *Marsupenaeus japonicus*, no Japão. Posteriormente, esses vírus foi associado a um caso de mortalidade em Taiwan, em 1992. Inicialmente a doença se disseminou rapidamente para o sudeste da Ásia e a Índia, por meio do comércio de pós-larvas e reprodutores, ocasionado uma pandemia naquele continente. O comércio mundial de animais e commodities propiciou uma rápida difusão da WSD em âmbito mundial, atingindo o sudeste europeu (1997), a América do Norte (1997), a América Latina (1999), o Oriente Médio (1999) e a Austrália (2006). No Brasil, essa doença foi reportada no ano de 2005. Atualmente, a enfermidade acomete os principais países produtores, em sua maioria endemicamente (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008; NUNAN; LIGHTNER, 2010; SRITUNYALUCKSANA et al., 2006). Em 1997, ela doença foi incluída na lista de notificação obrigatória da OIE (OIE, 2010). Na atualidade, a WSD é considerada o principal problema sanitário para a carcinicultura mundial (LIGHTNER, 2011; NUNAN; LIGHTNER, 2010; OIDTMANN; STENTIFORD, 2011).

2.2.1.2 Necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa

A necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa é uma doença que acomete os camarões cultivados comercialmente, sendo causada por um vírus de mesmo nome (*infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*, ou IHHNV). Esse foi descrito como agente etiológico de doença no ano de 1990 (BONAMI et al., 1990).

O IHHNV é o menor patógeno viral associado a enfermidades em camarões. Ele é caracterizado como um DNA vírus de fita simples, não envelopado, pertencente ao gênero *Brevidensovirus* (Família Parvoviridae). O genoma desse agente é linear, com 4,1 kb de tamanho. Seu virion apresenta 22 nm de tamanho, morfologia icosaédrica e densidade de 1,4 g/mL em cloreto de céσιο (LIGHTNER, 2011).

O IHHNV foi primeiramente descrito como causador de surtos em uma fazenda comercial de *Litopenaeus stylirostris* (camarão-azul-do-pacífico), no Havaí. Nesse caso, os animais eram cultivados em “raceways” e a doença foi caracterizada por altas taxas de mortalidade na fase de recria e engorda, na ausência de sinais clínicos característicos. Na mesma propriedade era realizada a criação de *L. vannamei* (LIGHTNER, 2011). Posteriormente à caracterização do vírus, foi constatado, nessa propriedade, o acometimento de animais da espécie *L. vannamei* pelo IHHNV. Porém, nesse caso, a infecção não ocasionava surtos com mortalidades significativas. Após alguns anos de monitoramento, esse agente etiológico foi associado a uma enfermidade crônica, denominada síndrome da deformação e dos refugos (SDR). Os animais doentes apresentam uma redução significativa no crescimento e deformações na cutícula, sem a ocorrência de mortalidades expressivas. Essa síndrome tem sido descrita também em cultivos de *Penaeus monodon* e *L. stylirostris* (LIGHTNER, 2011). Apesar da baixa letalidade, essa enfermidade apresenta elevado impacto

econômico, decorrente do aumento no custo de produção (redução na taxa de crescimento) e redução no valor comercial do produto. As deformações externas provocadas pelo IHHNV nos camarões infectados ocasionam perdas de 10% a 50% no valor de mercado desses. Isso devido ao aspecto repugnante conferido às carcaças e, conseqüentemente, a menor aceitação do produto pelos consumidores (HE; XU, 2011).

A severidade e a prevalência da SDR em populações de *L. vannamei* jovens e adultos são determinadas pela infecção durante a fase larval. O vírus pode ser transmitido de maneira horizontal (principalmente via canibalismo) e vertical. Esta última tem notória importância para a disseminação da doença. Reprodutores infectados podem transmitir o agente via ovócitos, produzindo progênies IHHNV positivas, as quais são assintomáticas nas fases iniciais do desenvolvimento, permitindo, assim, a introdução da doença nas fazendas via aquisição de pós larvas. Nesse contexto, a utilização de linhagens livre de patógenos específicos (SPF) ou aquisição de lotes IHHNV negativos tem sido preconizada como um dos pilares para o controle da doença (LIGHTNER, 2011).

Os principais sinais clínicos verificados em casos de SDR em *L. vannamei* são deformações na cutícula, principalmente nas antenas, cabeça e região abdominal. Também, redução significativa no crescimento dos animais e alta heterogeneidade dos lotes são observadas. Em condições de cultivo, populações livres de IHHNV apresentam coeficiente de variação (CV) do tamanho dos camarões menor que 30%. Contudo, em casos da doença, esse CV pode atingir 90%, afetando expressivamente o desempenho zootécnico da produção (MOTTE et al., 2003).

Na avaliação histopatológica dos animais infectados são observados proeminentes corpúsculos de inclusão Cowdry tipo A. Esses corpúsculos são eosinofílicos e associados às células com hipertrofia nuclear. As principais

células acometidas são as de origem ectodérmica (epiderme, nervo ganglionar etc.) e mesodérmica (órgãos hematopoiéticos, glândula antenal, gônadas, órgãos linfoides e tecido conjuntivo). Os corpúsculos de inclusão intranuclear do IHHNV são facilmente confundidos com os do WSSV, sendo primordial o diagnóstico diferencial (FLEGEL, 2006).

Nos anos subsequentes ao primeiro relato, em 1991, no Havaí, o IHHNV se disseminou amplamente pelas Américas, em populações de camarão cultivado e de vida livre. Na última década do século passado, esse patógeno já era detectado na costa do Pacífico, desde o Peru até o México. Na costa do Atlântico, esse vírus foi contemporaneamente diagnosticado no golfo do México (LIGHTNER, 2011). Em 1997, foi descrito em populações (cultivo e vida livre) de *Penaeus monodon* no sudeste da Ásia (FLEGEL, 2006). Em estudos moleculares foi demonstrada ampla variação entre os isolados asiáticos de IHHNV, enquanto pouca discrepância foi observada nos originários das Américas. Estes últimos têm padrão genético similar ao de amostras isoladas nas Filipinas. Com base nessas informações e no histórico de comércio de *P. monodon* vivos entre esse país e países das Américas nos anos 1970, sugere-se que o IHHNV tenha sido introduzido no continente Asiático a partir daí. Atualmente, somente a carcinicultura dos Estados Unidos tem o status de zona livre para IHHNV nas Américas (LIGHTNER, 2011). No Brasil, o IHHNV tem sido considerado um patógeno emergente, principalmente para a carcinicultura nordestina (TEIXEIRA-LOPES et al., 2011). Apesar de relatos contemporâneos da ocorrência da doença no país, não existem informações consistentes sobre sua introdução.

2.2.2 Estreptococoses em peixes

Estreptococose é o termo genérico utilizado para designar as doenças septicêmicas de etiologia bacteriana em peixes, causadas por cocos gram-positivos. Quatro gêneros bacterianos abrigam espécies associadas à doença em animais aquáticos. São elas: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e *Carnobacterium* (MATA et al., 2004). O primeiro caso de estreptococose em piscicultura foi reportado em 1956, no Japão, a partir de um surto de septicemia em uma fazenda comercial de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (HOSHINA et al., 1958). Desde então, diversas espécies de estreptococos e dos demais gêneros supracitados têm sido associadas a processos patogênicos. Adicionalmente, um número crescente de espécies de peixes e outros organismos aquáticos cultivados tem se apresentado como susceptível a essas infecções (AGNEW; BARNES, 2007; HASSON et al., 2009; NOBREGA-NETTO; LEAL; FIGUEIREDO, 2011; ROMALDE et al., 2008).

O número total de espécies bacterianas envolvidas em casos de estreptococoses em peixes é ainda impreciso, principalmente devido a dificuldades na identificação acurada dos isolados (AUSTIN; AUSTIN, 2007). Porém, até o presente momento, dez espécies são descritas como agentes etiológicos responsáveis por casos de doença em animais aquáticos, sendo elas: *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Vagococcus salmoninarum*, *Carnobacterium piscicola*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus phocae* e *Streptococcus ictaluri* (AGNEW; BARNES, 2007; DOMENECH et al., 1996; EVANS et al., 2002; MATA et al., 2004; NOBREGA-NETTO et al., 2011; NOMOTO et al., 2004; ROMALDE et al., 2008; SHEWMAKER et al., 2007; VENDRELL et al., 2006). Os agentes etiológicos causadores das estreptococoses podem ser divididos em dois grupos: os responsáveis pela

denominada estreptococose de “água fria”, que ocorre em temperaturas abaixo de 15 °C, tendo como representantes as bactérias *Lactococcus piscium* e *Vagococcus salmoninarum*, e as estreptococoses de “água quente”, que ocorrem em temperaturas acima de 15 °C. Essa última acomete peixes de água doce e marinhos e tem como representantes todas as demais espécies supracitadas (MATA et al., 2004; ROMALDE et al., 2008; SHEWMAKER et al., 2007; VENDRELL et al., 2006).

A ocorrência de surtos de estreptococose tem sido considerada como um dos principais entraves sanitários para o desenvolvimento da indústria piscícola mundial (AUSTIN; AUSTIN, 2007; GHITINO et al., 2003). Os casos dessas doenças vêm apresentando um incremento significativo nas últimas décadas, associado e como consequência da intensificação da aquicultura em todo o mundo. Estimativas não oficiais sugerem que as perdas anuais oriundas de surtos dessas enfermidades ultrapassem o valor de 150 milhões de dólares (AUSTIN; AUSTIN, 2007; ROMALDE et al., 2008).

A diversidade de espécies de organismos aquáticos cultivados e ambientes de criação ao redor do mundo, associada a novas tecnologias empregadas no diagnóstico e na identificação de microrganismos, amplia as possibilidades de caracterização de novos patógenos. Isso já é uma realidade para alguns grupos de microrganismos patogênicos, como no caso dos *Streptococcus*. No ano de 2007, a espécie *Streptococcus ictaluri* foi descrita a partir de surtos em fazendas de “catfish” americano (*Ictalurus punctatus*), nos EUA (SHEWMAKER et al., 2007).

Diferentemente das demais espécies de *Streptococcus*, os relatos de infecção causados por essa bactéria se restringem apenas aos peixes. Em 2009 foi relatada, pela primeira vez, a ocorrência de processos infecciosos em camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) causados por *Streptococcus* sp. (HASSON et al., 2009). Esses dados demonstram a abrangência e as

peculiaridades desses patógenos de organismos aquáticos e corroboram a tendência de caracterização de novas espécies bacterianas e hospedeiros susceptíveis.

Pertencente à família Streptococcaceae, o gênero *Streptococcus* detém uma grande variedade de espécies bacterianas patogênicas para seres humanos e animais, bem como microrganismos saprofíticos ou não patogênicos. Atualmente, 67 espécies e 12 subespécies são descritas como pertencentes a esse gênero (GLANUZOVA; RAOULT; ROUX, 2009; SHEWMAKER et al., 2007). Essas bactérias são cocos gram-positivos, com diâmetro de 0,5-2,0 µm, organizados em pares ou cadeias lineares curtas, catalase negativos, não móveis e não formadores de esporos (VICENT, 2005). Além das características fenotípicas, o tipo de hemólise e a sorotipagem baseada na antigenicidade de polissacarídeos capsulares (20 grupos, denominados Grupos de Lancefield) têm sido empregadas na caracterização das diferentes espécies de *Streptococcus*.

Seis espécies têm sido descritas como agentes etiológicos causadores de septicemia e meningoencefalite em peixes. São elas: *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus phocae* e *Streptococcus ictaluri* (EVANS et al., 2002; MATA et al., 2004; NOBREGA-NETTO; LEAL; FIGUEIREDO, 2011; NOMOTO et al., 2004; ROMALDE et al., 2008; SHEWMAKER et al., 2007).

No Brasil, três espécies de *Streptococcus* foram descritas como agentes etiológicos causadoras de septicemia e meningoencefalite em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus iniae* (MIAN et al., 2009; NOBREGA-NETTO et al., 2011; NOBREGA-NETTO; LEAL; FIGUEIREDO, 2011; SALVADOR et al., 2003, 2005). Esta última com apenas um caso descrito (NOBREGA-NETTO et al., 2011) e menor casuística que as demais. Além desses, a ocorrência de um caso de infecção por *Lactococcus garviae* em tilápia-do-nilo e pintado

(*Pseudoplatystoma corruscans*) foi reportada (EVANS; KLESIUS; SHOEMAKER, 2009). Porém, não existem referências sobre a origem dos animais e a ocorrência de um surto propriamente dito, dificultando a avaliação desse caso.

2.2.2.1 *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae é uma das principais espécies bacterianas do gênero *Streptococcus*. De importância médica e veterinária, esse microrganismo tem sido caracterizado como agente etiológico de doenças desde meados da década de 1930, sendo também conhecido como *Streptococcus* do Grupo B (GBS). As infecções causadas por esse patógeno em seres humanos são relevantes. O GBS é considerado o principal causador de meningoencefalite e morte por esse tipo de patologia em recém-nascidos (MAIONE et al., 2005). Adicionalmente, quadros de mamite clínica e subclínica em bovinos são ocasionados por essa bactéria, sendo impactante para a bovinocultura leiteira (KEEFE, 1997).

Nas últimas décadas, essa bactéria tem se destacado como patógeno emergente para a piscicultura mundial e tem sido caracterizada como agente etiológico de casos de septicemia e meningoencefalite em peixes. Taxas elevadas de mortalidade são observadas nos casos de surtos por *S. agalactiae* em fazendas de peixes de água doce, marinhos e de ambiente estuarino (EVANS et al., 2002; MIAN et al., 2009).

Casos de infecção por essa bactéria foram descritos, até o momento, em mais de vinte espécies de peixes (OLIVARES-FUSTER et al., 2008). No Brasil, o primeiro relato da ocorrência dessa doença foi feito no ano de 2003, quando diferentes surtos de estreptococose em tilapiculturas no norte do Paraná foram caracterizados (SALVADOR et al., 2003, 2005). Posteriormente, infecções causadas por *S. agalactiae* foram reportadas em tilapiculturas nos estados do

Paraná, São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais, Bahia, Ceará (FIGUEIREDO et al., 2006; MIAN et al., 2009), Santa Catarina e Mato Grosso. Apesar da ausência de dados oficiais, a casuística do Aquavet-Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG) demonstra que esse patógeno apresenta-se amplamente distribuído no território nacional, bem como, nos últimos cinco anos, sua frequência de ocorrência tem aumentado. Os processos infecciosos causados por esse microrganismo são considerados o principal risco sanitário para criações comerciais de tilápia-do-nylo no país, principalmente em sistemas de cultivo intensivos, como tanques-rede.

Os principais sinais clínicos verificados em peixes infectados são melanose, taquipneia, anorexia, excitabilidade, natação errática e em rodopios, rigidez dorsal e escoliose, exoftalmia unilateral ou bilateral, ascite e morte súbita com ausência de sinais clínicos em casos superagudos (EVANS et al., 2002; MIAN et al., 2009). Em tilápias, as principais alterações histopatológicas observadas em casos de estreptococose por *S. agalactiae* são pericardite, epicardite, miocardite, endocardite e meningite, associadas à presença de grande número de cocos gram-positivos presentes nos tecidos e na corrente sanguínea (CHEN; CHA; BOWSER, 2007).

Devido à importância das infecções por *S. agalactiae* em seres humanos, diversos fatores de virulência e mecanismos envolvidos na patogênese da doença em mamíferos têm sido descritos e caracterizados (RAJAGOPAL, 2009). Em peixes, os mecanismos envolvidos nos processos infecciosos causados por esse patógeno são pouco compreendidos.

Em trabalho recente (GODOY et al., 2011), foi demonstrado que as amostras brasileiras de *S. agalactiae*, isoladas de tilápia-do-nylo e pintado amazônico (*Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma fasciatum*), apresentam uma carga básica de genes de virulência comum (*iagA*, *cfb*, *fbSA*, *fbSB* e *gbs*

2018). Esses fatores de virulência estão associados à aderência e à invasão celular.

Outros fatores de virulência (*cylE* e *hylB*), ligados à citotoxicidade direta e à lise tecidual, foram encontrados com frequência variável nas amostras. A presença desses genes conferiu um incremento significativo na virulência das amostras para alevinos de tilápia-do-nylo, com redução na dose letal 50% de aproximadamente 100 vezes (GODOY et al., 2011). Porém, novos estudos devem ser realizados para avaliar o real papel desses na patogênese da doença.

Apesar de ser a mesma espécie bacteriana, as amostras isoladas de peixes apresentam padrão genético distinto das isoladas de seres humanos e bovinos (PEREIRA et al., 2010). Contudo, em estudo recente realizado por Pereira et al. (2010) foi demonstrado que, em condições experimentais, as amostras de seres humanos são capazes infectar alevinos de tilápia-do-nylo. Porém, esses isolados apresentam virulência significativamente menor que a das amostras isoladas de peixes. Em trabalho posterior realizado pela mesma equipe (GODOY et al., 2011) foi demonstrado que as amostras de seres humanos e peixes compartilham alguns fatores de virulência. Entretanto, existem alguns com características de hospedeiro específicas. Assim sendo, a maior patogenicidade para um hospedeiro possivelmente é determinada ou propiciada por esses fatores específicos.

Altamente virulenta para peixes, os casos de infecção por *S. agalactiae* são verificados principalmente em peixes adultos. Contudo, em condições experimentais, a doença pode ser reproduzida em alevinos e juvenis (EVANS et al., 2002; MIAN et al., 2009). Os principais fatores de risco para a ocorrência de surtos são aumento da temperatura (acima de 27 °C), manejo intensivo e altas densidades de estocagem (MIAN et al., 2009). Adicionalmente, para tilápias-do-nylo cultivadas em tanques-rede, os processos de seleção e classificação têm sido caracterizados como desencadeadores de surtos.

Elevadas taxas de mortalidades são verificadas nos casos de surtos causados por *S. agalactiae* em tilapiculturas, podendo atingir níveis acima de 90%. Esses são comumente verificados e particularmente importantes na introdução desses agentes em propriedades livres, ocasionando um impacto devastador na criação, podendo dizimar o plantel (PASNIK, 2005; PASNIK; EVANS; KLESIUS, 2005).

2.2.2.1 *Streptococcus dysgalactiae*

Streptococcus dysgalactiae é um patógeno bem caracterizado e associado a processos infecciosos em seres humanos e bovinos. Nesses hospedeiros, essa bactéria está associada a casos de faringite e mamite, respectivamente (AARESTRUP; JESEN, 1996; WAAGE et al., 1999; WILLIANS, 2003). Esse microrganismo faz parte do Grupo C de Lancefield e possui duas subespécies associadas a infecções em mamíferos, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* e *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (WILLIANS, 2003).

Em 2002, a bactéria *S. dysgalactiae* foi associada a processos infecciosos em peixes. O primeiro relato foi feito a partir de surtos em fazendas comerciais de “amberjack” (*Seriola dumerili*) e “yellowtail” (*S. quinqueriata*), no Japão (NOMOTO et al., 2004). Nos anos subsequentes, mortalidades severas foram observadas em diversas propriedades naquele país e atribuídas à infecção causada por esse agente (ABDELSALAM; CHEN; YOSHIDA, 2010). Os isolados dessas espécies de peixes foram identificados, por métodos fenotípicos e moleculares, como *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (NOMOTO; KAGAWA; YOSHIDA, 2008).

Atualmente, existem relatos da ocorrência da doença causada por esse patógeno em dez espécies de peixes, sendo nove marinhas e uma de água doce (ABDELSALAM; CHEN; YOSHIDA, 2010; NOBREGA-NETTO; LEAL;

FIGUEIREDO, 2011). Em pisciculturas marinhas, os casos reportados são originários do Japão, Taiwan, China, Indonésia, e Malásia (ABDELSALAM; CHEN; YOSHIDA, 2010).

O único relato da ocorrência da enfermidade causada por esse agente etiológico em peixes de água doce foi realizado no Brasil. A bactéria *S. dysgalactiae* foi associada a um caso de surto em 2007, em uma fazenda de tilápia-do-nilo no estado do Ceará (NOBREGA-NETTO; LEAL; FIGUEIREDO, 2011). Posteriormente, outros dois casos, nos estados de Alagoas e Ceará, foram acompanhados. Porém, estudos adicionais devem ser realizados para determinar a prevalência desse microrganismo nas principais regiões produtoras do país.

As infecções por *S. dysgalactiae* em peixes apresentam sinais clínicos peculiares em relação às demais estreptococoses. A doença é caracterizada pela presença de abscessos subcutâneos multifocais e focos de necrose localizados, principalmente, na região do pedúnculo caudal e musculatura lateral. Adicionalmente, alterações genéricas, como anorexia e letargia, têm sido observadas em peixes marinhos clinicamente afetados. Contudo, sinais clínicos de septicemia bacteriana e meningoencefalite não são usualmente verificados nos animais acometidos, exceto a ocorrência de esplenomegalia. Durante os surtos em pisciculturas marinhas, taxas de mortalidade de 30% a 50% têm sido reportadas. A doença acomete, principalmente, peixes de tamanho comercial, com peso vivo entre 1 e 3 kg (HAGIWARA et al., 2009; NOMOTO et al., 2004, 2006).

Os surtos em tilapiculturas cursam com sintomatologia clínica similar. Porém, menores taxas de mortalidade são verificadas. Apesar de não promover grandes mortalidades, a ocorrência da enfermidade é altamente impactante, pois ocasiona o descarte pós-abate de grande parte dos lotes acometidos, devido à presença das lesões na carcaça (NOBREGA-NETTO; LEAL; FIGUEIREDO, 2011).

Em laboratório, a infecção por *S. dysgalactiae* foi reproduzida em *Seriola dumerili* para a determinação das alterações patológicas promovidas. Sob condições experimentais, a doença promoveu a formação de microabscessos e focos de inflamação piogranulomatosa nos peixes infectados. Essas lesões foram detectadas em diversos órgãos, como coração, trato olfatório, pedúnculo caudal, nadadeira peitoral e caudal (HAGIWARA et al., 2009). Já em alevinos de tilápia-do-nilo, uma doença superaguda, com ausência de sinais clínicos característicos, foi observada na infecção experimental. Nessa espécie não foi possível a reprodução da manifestação clínica da enfermidade verificada a campo, principalmente os abscessos multifocais (NOBREGA-NETTO; LEAL; FIGUEIREDO, 2011).

2.3 Diagnóstico de doenças infecciosas em animais aquáticos

2.3.1 PCR em tempo real

A PCR em tempo real é uma técnica que combina a amplificação de sequências específicas de DNA, realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com a detecção fluorescente dos amplicons, simultaneamente, em um mesmo tubo (ESPY et al., 2006). A PCR evoluiu de uma reação laboriosa e demorada, com avaliação visual dos géis e inferência qualitativa, para um método quantitativo, que utiliza a precisão da ótica e fluoróforos com afinidade por DNA ou sondas fluorescentes para a detecção em tempo real dos produtos da reação (BUSTIN, 2010). Essa tecnologia tem revolucionado a forma como os laboratórios clínicos realizam o diagnóstico de patógenos humanos (ESPY et al., 2006). Da mesma maneira, a PCR em tempo real tem sido empregada com sucesso na detecção de agentes etiológicos de doenças em animais aquáticos e terrestres (BELAK, 2007; YANG et al., 2009).

Diferentes tecnologias e químicas têm sido utilizadas nas técnicas de PCR em tempo real. As principais são SYBR Green, sondas de hidrólise (popularmente conhecidas como sondas “TaqMan”), “molecular beacons”, “scorpion primer”, sondas de hibridização (“FRET probes”) e sistemas de transferência de energia “primer-probe” (PriProE), entre outros (BELAK, 2007; ESPY et al., 2006). Comparadas a PCR convencional, simples ou “nested”, a PCR em tempo real apresenta, como principais vantagens, celeridade no processo e otimização da capacidade de processamento dos laboratórios; ausência de procedimentos pós reação; sensibilidade clínica maior ou igual a PCR “nested”; a detecção dos amplicons é realizada no interior dos tubos sem a necessidade de abertura, reduzindo a possibilidade de contaminação; resultados quantitativos, permitindo inferências sobre as cargas infectantes; é mais acurada e menos dispendiosa que outros métodos quantitativos; menor risco para operadores humanos, principalmente devido a não necessidade de revelação dos géis com brometo de etídio; permite a automação do processo e o emprego de sistemas robotizados e maior possibilidade de emprego de reações “multiplex” (BELAK, 2007; JANG et al., 2009; XIE et al., 2008; YANG et al., 2009).

As reações com SYBR Green e sondas de hidrólise ou TaqMan são as tecnologias que têm sido preponderantemente empregadas em protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico de doenças de animais (BELAK, 2007). O SYBR Green é um corante que tem afinidade, preferencialmente, por DNA fita dupla, que quando ligado a essas moléculas, emite fluorescência verde (520 nm). Durante a amplificação, essa substância interage com os amplicons recém-sintetizados, produzindo uma fluorescência diretamente proporcional à quantidade desses. Essa tecnologia apresenta com principal desvantagem a inespecificidade, pois reconhecerá qualquer DNA fita dupla na reação, sendo este alvo da mesma um contaminante ou produto inespecífico (ESPY et al., 2006).

As sondas de hidrólise são pequenas sequências de oligonucleótidos (20 a 30 pares de base), marcadas com um fluoróforo na extremidade 5' e um “quencher” fluorescente na extremidade 3'. O “quencher” mais utilizado, e padrão da tecnologia TaqMan, é o N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA). As sondas são desenhadas com o objetivo de reconhecer e hibridizar uma parte do interior da sequência alvo da PCR. A enzima Taq polimerase tem a atividade de Dnase e, sendo assim, durante a amplificação, as sondas hibridizadas no interior da sequência alvo serão clivadas. Uma vez distante do “quencher”, o fluoróforo passa a emitir fluorescência, que é detectada pelo equipamento. Essa fluorescência será diretamente proporcional ao número de amplicons produzidos, permitindo a inferência quantitativa e em tempo real do processo. Essa tecnologia apresenta como vantagem maior especificidade, pois, além dos “primers”, as sondas reconhecerão uma sequência específica do material genético. Além disso, permitem o desenvolvimento de protocolos multiplex, pois diferentes sondas com fluoróforos e alvos distintos podem ser empregadas em uma mesma reação (BELAK, 2007; BUSTIN, 2010).

Apesar de amplamente utilizadas, as sondas contendo “quencher” fluorescente apresentam, como desvantagem, a emissão de fluorescência de “background”. Essa fluorescência pode reduzir a sensibilidade analítica e clínica dos protocolos de PCR em tempo real, pois dificulta a detecção dos fluoróforos. Recentemente, foram desenvolvidos “quenchers” não fluorescentes para utilização em técnicas de PCR em tempo real. Estes “quenchers” captam os fótons emitidos pelos fluoróforos e reemitem essa energia na forma de calor. Sendo assim, promovem uma redução significativa no background das reações, aumentando sua sensibilidade (DAUM et al., 2004; YANG et al., 2009).

Essa tecnologia tem apresentado resultados superiores em relação a sondas TaqMan para diagnóstico de patógenos respiratórios de seres humanos (YANG et al., 2009).

2.3.2 Diagnóstico de doenças virais de camarão

Métodos histológicos, microbiológicos, imunológicos e de biologia molecular têm sido utilizados para o diagnóstico de doenças infecciosas em camarão (CHOU et al., 2011; DURAND; LIGHTNER, 2010; SAMANMAN et al., 2011). Como premissa básica, essas técnicas devem ser rápidas e de custo acessível, bem como possuir alta sensibilidade e especificidade (JANG et al., 2009; YAN et al., 2009).

De acordo com o Manual para Diagnóstico de Doenças de Animais Aquáticos da OIE, a doença da mancha-branca pode ser diagnosticada por exame histopatológico, microscopia eletrônica de transmissão, hibridização *in situ* e PCR (OIE, 2009). A PCR “nested”, descrita por Lo et al. (1996), é considerada técnica “ouro” para o diagnóstico dessa enfermidade. Contudo, problemas com contaminação e resultados falsos positivo têm sido observados com o uso dessa técnica (DURAND; LIGHTNER, 2010). O diagnóstico da IHNV é realizado por exame histopatológico, microscopia eletrônica de transmissão, hibridização “*in situ*”, PCR e PCR em tempo real (OIE, 2009).

Com a popularização das técnicas de biologia molecular, a PCR convencional tem sido amplamente utilizada e recomendada para o diagnóstico de doenças virais em camarão (LIGHTNER, 2011). Apesar disso, esses métodos apresentam menor sensibilidade analítica e clínica, além de serem relativamente demoradas em comparação a outros métodos disponíveis (DURAND; LIGHTNER, 2010). Nesse contexto, a PCR em tempo real apresenta-se como uma alternativa viável para o diagnóstico dessas enfermidades. Atualmente, reações desenvolvidas para a detecção dos seguintes vírus de camarão WSSV, IHNV, HPV, TSV e IMNV estão disponíveis (ANDRADE et al., 2007; CHOU et al., 2011; DURAND; LIGHTNER, 2002; JANG et al., 2009; LIGHTNER, 2011; SRITUNYALUCKSANA et al., 2006; TANG; LIGHTNER, 2001). Além

das vantagens descritas anteriormente, essa tecnologia permite a detecção de casos de coinfeção por diferentes vírus em camarão, por meio do emprego de reações “multiplex” (TANG; LIGHTNER, 2011). Esse fenômeno biológico (coinfeção) tem sido descrito e é usualmente verificado em animais cultivados no Brasil e no mundo (TEIXEIRA-LOPES et al., 2011; XIE et al., 2008; YANG et al., 2006).

Yang et al. (2006) desenvolveram uma PCR multiplex para o diagnóstico de casos de coinfeção por WSSV e IHHNV e, primeiramente, descreveram a ocorrência desses em *Litopenaeus vannamei* cultivado. Posteriormente, uma multiplex PCR em tempo real para a detecção simultânea dos vírus WSSV, IHHNV e TSV foi desenvolvida (XIE et al., 2008). Essas técnicas apresentaram problemas, principalmente quanto à sensibilidade, quando comparadas às reações isoladas. Sendo assim, o desenvolvimento e a padronização de novas reações são uma demanda vigente.

2.3.3 Diagnóstico das estreptococoses

O diagnóstico das estreptococoses em peixes é baseado no isolamento e na identificação dos microrganismos (MATA et al., 2004; MIAN et al., 2009). Os órgãos de predileção para a coleta de material para a realização de exames bacteriológicos variam de acordo com a doença e bactéria envolvida no processo infeccioso. As estreptococoses são doenças associadas a quadros de septicemia e meningoencefalite. Sendo assim, o sistema nervoso central e órgãos altamente vascularizados ou que desempenhem funções imunológicas, como rim, fígado e baço, são indicados (NOGA, 1996).

Até recentemente, a identificação dos microrganismos do gênero *Streptococcus* era baseada no tipo de hemólise, padrão de antígenos capsulares (Grupo de Lancefield) e testes bioquímicos (GLAZUNOVA; RAOULT; ROUX,

2009). Contudo, somente a caracterização fenotípica básica tem dificultado e diminuído a acurácia da identificação e classificação dos isolados. Isso decorre das diferenças no padrão fenotípico das diferentes cepas e amostras (NHO et al., 2009).

A utilização de kits comerciais de identificação fenotípica de *Streptococcus*, como RAPID32 (BioMerieux, França), API 20 Strep (BioMerieux, França) ou sistemas automatizados como Biolog (Biolog Inc., EUA) e Vitek (BioMerieux, França), são alternativas interessantes. Estes links apresentam boa aplicabilidade, maior acurácia na análise e economia de tempo em relação a provas bioquímicas convencionais. Porém, eles se prestam exclusivamente ao diagnóstico de espécies causadoras de doenças em peixes e mamíferos, como, por exemplo, *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae*. No caso de patógenos específicos para animais aquáticos, como *S. iniae*, *S. phocae* e *S. ictaluri*, sua eficiência pode ser baixa. Isso se deve ao fato de os bancos de dados desses sistemas não contemplarem informações sobre microrganismos patogênicos para hospedeiros não humanos. Sendo assim, resultados inconclusivos são obtidos quando esses isolados são avaliados (AGNEW; BARNES, 2007).

Nos últimos anos, o desenvolvimento e a popularização de técnicas moleculares para taxonomia de microrganismos e diagnóstico de doenças incrementaram significativamente a capacidade de identificar agentes etiológicos. As principais ferramentas moleculares empregadas para a identificação de *Streptococcus* patogênicos para peixes têm sido baseadas na realização de reações de PCR espécie específicas ou para amplificação de genes conservados, associadas ao sequenciamento e à análise filogenética (AGNEW; BARNES, 2007). A análise filogenética e a determinação dos possíveis representantes do gênero *Streptococcus* foram baseadas, inicialmente, na avaliação do gene RNA ribossômico 16S. O sequenciamento desse gene permite

um diagnóstico acurado das espécies bacterianas, até mesmo de amostras com padrões atípicos, diferentemente da caracterização fenotípica (WOO et al., 2008).

Apesar de rotineiramente utilizados, os métodos microbiológicos apresentam menor sensibilidade e especificidade em comparação a métodos histológicos, imunoistoquímicos e moleculares (PCR) (JIMÉNEZ et al., 2011). Contudo, todas essas técnicas possuem limitações para a avaliação de animais em fases iniciais da doença e portadores assintomáticos. Nesses quadros clínicos os patógenos apresentam baixas cargas infectantes ou não induzem alterações histopatológicas. Sendo assim, não propiciam sua detecção pelas técnicas supracitadas. O diagnóstico desses casos é de importância crucial para os programas de controle da doença (AUSTIN; AUSTIN, 2007). Nesse contexto, as reações de PCR em tempo real podem ser uma alternativa para a solução desse problema. Atualmente, não existem descrições de protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico dos patógenos de peixes *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae*.

3 CONCLUSÕES

Como conclusões destacam-se:

- a) as sondas de hidrólise contendo “quencher” não fluorescente permitiram a otimização da qPCR para o diagnóstico de WSSV, aumentando a sensibilidade clínica da reação;
- b) a PCR em tempo real duplex para detecção de WSSV e IHHNV apresentou resultados similares aos dos métodos simples e foi capaz de detectar casos naturais de coinfeção em camarão cultivado, sendo uma alternativa viável para o diagnóstico dessas enfermidades;
- c) as PCR em tempo real simples e “duplex” desenvolvidas para o diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* apresentaram maior sensibilidade clínica que métodos microbiológicos e PCR convencional para casos de infecção em tilápia-do-nilo, constituindo uma valiosa ferramenta para a detecção desses agentes.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; JENSEN, N. E. Genotypic and phenotypic diversity of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 3/4, p. 315-323, Dec. 1996.

ABDELSALAM, M.; CHEN, S.; YOSHIDA, T. Phenotypic and genetic characterizations of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from fish collected in Japan and other Asian countries. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 302, n. 1, p. 32-38, Feb. 2010.

AGNEW, W.; BARNES, A. C. *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and challenging candidate for reliable vaccination. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1, p. 1-15, Mar. 2007.

ANDRADE, T. P. D. et al. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 264, n. 1, p. 9-15, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Estatística do setor pesqueiro e da carcinicultura brasileira**. Natal, 2010. 6 p.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish**. 4th ed. Chichester: Springer, 2007. 552 p.

BELAK, S. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects A view from the OIE collaborating centre for the application of polymerase chain reaction methods for diagnosis of viral diseases in veterinary medicine. **Vaccine**, Kidlington, v. 25, n. 30, p. 5444-5452, Dec. 2007.

BONAMI, J. R. et al. Purification and characterization of IHHN virus of penaeid shrimps. **Journal of General Virology**, London, v. 71, n. 11, p. 2657-2664, Nov. 1990.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2008 e 2009**. Brasília, 2010. 101 p.

_____. **Saúde animal na carcinicultura marinha brasileira**. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2011/NOVEMBRO/nt_NOV_30-11-Saude-Animal-na-Carcinicultura>. Acesso em: 10 dez. 2011.

BUSTIN, S. A. Why the need for qPCR publication guidelines?: the case for MIQE. **Methods**, San Diego, v. 50, n. 4, p. 217-226, Apr. 2010.

CHEN, C. Y.; CHA, C. B.; BOWSER, P. R. Comparative histopathology of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae*-infected tilapia. **Bulletin of The European Association of Fish Pathologists**, London, v. 27, n. 1, p. 2-9, Mar. 2007.

CHOU, C. et al. Real-time target-specific detection of loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus using fluorescence energy transfer-based. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 67-74, Jan. 2011.

DAUM, L. T. et al. Comparison of TaqMan and Epoch Dark Quenchers during real-time reverse transcription PCR. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 18, n. 3, p. 207-209, June 2004.

DOMENECH, A. et al. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 33-38, Jan. 1996.

DURAND, S. V.; LIGHTNER, D. V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 381-394, July 2002.

EL-SAYED, A. F. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* **Aquaculture**, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 149-168, 1999.

ESCOBEDO-BONILLA, C. M. et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 1-18, Jan. 2008.

ESPY, M. J. et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 2, p. 165-256, Apr. 2006.

EVANS, J. J. et al. Characterization of β -haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 505-513, Sept. 2002.

EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A. First isolation and characterization of *Lactococcus garviae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix and Agassiz). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 32, n. 9, p. 943-951, Oct. 2009.

FIGUEIREDO, H. C. P. et al. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 678-680, ago. 2006.

FITZSIMMONS, K. Future trends of tilapia aquaculture in Americas. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. (Ed.). **Tilapia aquaculture in the Americas**. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2000. v. 2, p. 252-264.

FLEGEL, T. W. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 258, n. 1, p. 1-33, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2008. 196 p.

_____. _____. Rome, 2010. 218 p.

GHITINO, C. et al. Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. **Veterinary Research Communications**, Pretoria, v. 27, n. 1, p. 471-479, Sept. 2003.

GLAZUNOVA, O. O.; RAOULT, D.; ROUX, V. Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL*, and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, Reading, v. 59, n. 9, p. 2317-2322, Sept. 2009.

GODOY, M. et al. Clonality, virulence genes, and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from fish. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, 2011. In press.

HAGIWARA, H. et al. A study of the lesions induced in *Seriola dumerili* by intradermal or intraperitoneal injection of *Streptococcus dysgalactiae*. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 140, n. 1, p. 25-30, Jan. 2009.

HASSON, K. W. et al. Streptococcosis in farmed *Litopenaeus vannamei*: a new emerging bacterial disease of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 86, n. 1, p. 93-106, Feb. 2009.

HE, L.; XU, H. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 311, n. 1, p. 94-99, 2011.

HOSHINA, T. et al. A *Streptococcus* pathogenic to fish. **Journal of Tokyo University of Fisheries**, Tokyo, v. 44, p. 57-68, 1958.

JANG, I. et al. A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstock and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 287, n. 1, p. 40-45, 2009.

JIMÉNEZ, A. et al. Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis sp.*) tissue. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 321, n. 2, p. 203-206, 2011.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 38, n. 7, p. 429-437, July 1997.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in Western Hemisphere (the Americas): a review. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 106, n. 1, p. 110-130, Jan. 2011.

LIGHTNER, D. V. et al. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 16, n. 2, p. 146-160, 1997.

LO, C. F. et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crab and other arthropods. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 27, n. 3, p. 215-225, Jan. 1996.

MAOINE, D. et al. Group B *Streptococcus* Vaccine by multiple genome screen. **Science**, New York, v. 309, n. 5731, p. 148-150, July 2005.

MATA, A. I. et al. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. **Applied and Environmental Microbiology**, Netherlands, v. 70, n. 5, p. 3183-3187, May 2004.

MIAN, G. F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 180-183, Apr. 2009.

MOTTE, E. et al. Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 219, n. 1, p. 57-70, 2003.

NHO, S. et al. Phenotypic characteristics of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 293, n. 1, p. 20-27, 2009.

NOBREGA-NETTO, L. et al. *Streptococcus iniae* outbreaks in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, 2011. In press.

NOBREGA-NETTO, L.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 34, n. 9, p. 251-254, Jan. 2011.

NOGA, E. J. **Fish diseases: diagnosis and treatment**. Saint Louis: Mosby-Year Book, 1996. 367 p.

NOMOTO, R. et al. Characterization of group C *Streptococcus dysgalactiae* isolated from farmed fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 29, n. 11, p. 673-682, Nov. 2006.

_____. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 679-686, Dec. 2004.

NOMOTO, R.; KAGAWA, H.; YOSHIDA, T. Partial sequencing of *sodA* gene and its application to identification of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolated from farmed fish. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 95-100, Jan. 2008.

NUNAN, L. M.; LIGHTNER, D. V. Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 171, n. 1, p. 318-321, Jan. 2011.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Aquatic animal health code**. 13th ed. Paris, 2010. 306 p.

_____. **Diagnostic manual for aquatic animal diseases**. 6th ed. Paris, 2009. 383 p.

OIDTMANN, B.; STENTIFORD, G. D. White Spot Syndrome Virus (WSSV) concentrations in crustacean tissues: a review of data relevant to assess the risk associated with commodity trade. **Transboundary and Emerging Diseases**, New York, v. 58, n. 6, p. 469-482, Dec. 2011.

OLIVARES-FUSTER, O. et al. Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 277-283, Apr. 2008.

PASNIK, D. J. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 205-212, Apr. 2005.

PASNIK, D. J.; EVANS, J. J.; KLESIUS, P. H. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 66, n. 1, p. 129-234, Feb. 2005.

PEREIRA, U. P. et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 1/2, p. 186-192, Jan. 2010.

RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. **Future Microbiology**, London, v. 4, n. 2, p. 201-221, Mar. 2009.

ROMALDE, J. L. et al. *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 2, p. 198-207, Apr. 2008.

SALVADOR, R. et al. Isolamento e caracterização de *Streptococcus* spp. do grupo B em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques rede e em viveiros de terra na região norte do Estado do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, nov./dez. 2005.

_____. Isolation of *Streptococcus* spp. from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and quality of water in hapas nets in North Region of Parana State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 35-42, jan./fev. 2003.

SAMANMAN, S. et al. Highly sensitive capacitive biosensor for detecting white spot syndrome virus in shrimp pond water. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 75-84, Jan. 2011.

SHEWMAKER, P. L. et al. *Streptococcus ictaluri* sp. nov., isolated from Channel Catfish *Ictalurus punctatus* broodstock. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 7, p. 1603-1606, July 2007.

SRITUNYALUCKSANA, K. et al. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, n. 1, p. 95-104, 2006.

TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 44, n. 1, p. 79-85, Feb. 2001.

TEIXEIRA-LOPES, M. A. et al. Natural co-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and infectious myonecrosis virus (IMNV) in *Litopenaeus vannamei* in Brazil. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 312, n. 2, p. 212-216, 2011.

VENDRELL, D. et al. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 177-198, Mar. 2006.

VERA-CALDERON, L. T.; FERREIRA, A. C. M. Estudo da economia de escala na piscicultura em tanque-rede no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 7-17, Jan. 2004.

VICENT, W. F. An overview of genus streptococcus. **Quest Diagnostics Infectious Diseases Update**, Reading, v. 12, n. 1, p. 13-22, June 2005.

WAAGE, S. et al. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 4, p. 712-719, Apr. 1999.

WILLIAMS, G. S. Group C and G streptococci infections: emerging challenges. **Clinical Laboratory Science**, Washington, v. 16, n. 4, p. 209-213, 2003.

WOO, P. C. Y. et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 14, n. 10, p. 908-934, Oct. 2008.

XIE, Z. et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for detection of viral pathogens of penaeid shrimp. **Archives of Virology**, New York, v. 153, n. 12, p. 2245-2251, Nov. 2008.

YANG, G. P. et al. Evaluation of tetramethylrhodamine and black hole quencher 1 labeled probes and five commercial amplification mixes in TaqMan® real-time RT-PCR assays for respiratory pathogens. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 169, n. 1/2, p. 288-290, Dec. 2009.

SEGUNDA PARTE-ARTIGOS

ARTIGO 1

SHORT COMMUNICATION

**Comparative analysis of conventional PCR and real-time PCR to diagnose
shrimp WSD**

(Artigo submetido à revista “Brazilian Journal of Microbiology”)

C. A. G. Leal¹; G. A. Carvalho-Castro¹; A. C. Cottorello²; R. C. Leite¹; H. C. P.
Figueiredo^{1*}.

¹AQUAVET - Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Federal University of
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

²LANAGRO - National Animal and Plant Laboratory, Ministry of Agriculture
(MAPA), Pedro Leopoldo, MG, Brazil.

***Corresponding Author. Mailing Address:** AQUAVET- Laboratory of Aquatic
Animal Diseases, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG,
Brazil. 30123-970.; Tel.: +55 31 34092126, Fax: +55 31 3409 2080; E-mail:
henrique@dmv.ufla.br

Abstract

The aims of this study were to standard and optimize a qPCR protocol with FAM-BHQ1 probe, and to compare its sensitivity against TaqMan qPCR and PCR methods to diagnose shrimp WSD. The FAM-BHQ1 qPCR presented higher clinical sensitivity and showed to be a robust alternative to detect WSSV in clinical samples.

Keywords: clinical samples, sensitivity, real-time PCR, WSSV, WSD.

White spot disease (WSD) is one of the most important viral diseases for marine shrimp culture, causing serious mortalities to economically important species, such as *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* (16). Etiologic agent of WSD, the white spot syndrome virus (WSSV) is a bacilliform, non-occluded enveloped, double-stranded DNA virus of Nimaviridae family (7, 17). The illness was firstly reported in 1992 in Taiwan. Since then, the continuous spread of disease has been described, mainly throughout the regions of important shrimp production (Asia and the Americas) (7, 11, 17). Currently, WSD is considered one of the main barriers for successful expansion of shrimp industry worldwide (11, 12).

Several methods have been used to diagnose WSD in shrimp, including histopathology, immunological assays, *in situ* hybridization and molecular techniques (3, 5, 15). PCR-based assays offer high degrees of sensitivity and specificity (3); being the Nested PCR protocol developed by Lo *et al.* (10), the gold standard recommended by the OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (13). Despite of the advantages, the WSSV Nested-PCR is a two steps, time consuming method and false positive results can be obtained (11). Quantitative Real-time PCR (qPCR) has been successfully used to quantify different viral infections in shrimp, showing to be fast, sensitive and specific (9).

Many different Sybr-green and TaqMan qPCR have been developed to detect WSSV (3, 5, 9, 17). However, these techniques were not included in the OIE Manual (13) as a recommended method. Contradictory results, variable reproducibility and sensibility data have been verified while using that (5, 6, 17).

The aim of this study was to standard a qPCR protocol based in dual-labeled hydrolysis probe technology, with non-fluorescent quencher (Black Hole Quencher, BHQ1), to diagnose WSD. In addition, to compare the clinical sensitivity of the this protocol against previously developed PCR (Nested PCR and TaqMan qPCR) to detect WSSV in clinical samples of diseased shrimp.

Diseased and health *Litopenaeus vannamei* were collected during outbreaks of WSD in shrimp farms, located in two Brazilian States (Santa Catarina and Bahia). The samples were 96% ethanol preserved and immediately conducted to LANAGRO- National Animal and Plant Laboratory of Brazilian Ministry of Agriculture, situated in Pedro Leopoldo (Minas Gerais State). The total shrimp DNA was extracted from three left abdominal pleopods of each animal, using the commercial kit Wizard[®] DNA Genomic Purification (Promega, USA). The amount of extracted DNA was quantified spectrophotometrically with GE NanoVue[®] Spectrophotometer (GE Healthcare, UK). The DNA samples were stocked at -20°C until use.

The primers sets 146F1 (5'ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG 3') / 146R1 (5' TAATGCGGGTGTAAATGTTCTTACGA3'), and 146F1/146R1 plus 146F2 (5' GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA 3')/146R2 (5' TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT 3') were respectively used for one-step and two steps (Nested) WSD PCR. The different qPCR methods were performed using the primer set WSS1011F (5' TGGTCCCGTCCTCATCTCAG 3') / WSS1079R (5'GCTGCCTTGCCGGAAATTA 3') and probe (5' AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA 3') (5). Two probe types were tested: a TaqMan probe (Applied Biosystems, USA) labeled with fluorescent

dyes 5-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' end and N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end; and dual-labeled hydrolysis probe with fluorescent dye FAM on the 5' end and the non-fluorescent quencher, Black Hole Quencher® 1 (Sigma-Aldrich, USA), on the 3' end (FAM-BHQ1). All primers used were acquired from Integrated DNA Technologies (IDT, USA).

The one step and two steps WSD PCR were performed as described previously (13). Briefly, PCR mixture of both reactions consisted of: 1X GoTaq Flexi Buffer (Promega); 1.5 mM MgCl₂; 200 uM of each dNTP; 100 pmol of each primer; and 2 U of GoTaq DNA Polymerase (Promega). 10 uL of one step reaction was used as template for the two steps PCR. Cycling conditions for both assays was 94°C for 4 minutes followed by 39 cycles of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 2 minutes and a final extension step at 72°C for 5 minutes. The products were visualized in 1% agarose gel electrophoresis containing 0.5 ug.mL⁻¹ of ethidium bromide. The expected amplicon sizes were respectively 1447 and 941 bp, for one and two step reaction. A purified plasmid containing the WSSV genomic sequence U50923 was used as positive control. It was serially 10-fold diluted to standard curve construction in qPCR analysis. Six plasmid dilutions were used to determine the analytical sensitivity of different assays. The amount of plasmid copies ranged from 2 to 2 x 10⁵.

qPCR reactions with TaqMan and FAM-BHQ1 were optimized for primers and probe concentrations, and compared with previously described reaction (5). A set of standard curves was created using six dilutions of control plasmid. The primers were evaluated at concentrations ranging from 5 to 100 pmol and probes varied from 5 to 75 pmol per reaction. The standard curves were evaluated in triplicate for each qPCR mixture tested. The best reaction was determined based in: slope factor (-3.1035 to -3.7762); correlation coefficient (above 0.99); and lower average quantification cycle (C_q) for each dilution (1, 8). All qPCR assays were performed in an ABI 7500 Real-time System (Applied

Biosystems) and TaqMan Universal Master Mix with ROX as passive reference (Applied Biosystems) was used. The qPCR cycling consisted of 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 60 seconds. Data acquisition and analysis were performed using 7500 Software Version 2.0 (Applied Biosystems). The qPCR data were evaluated and are presented according to MIQE guidelines (1, 2).

The clinical sensitivity of the qPCR protocols were addressed in comparison with conventional PCR methods. Thus, total DNA of 23 clinical samples, 15 WSD positive and 8 WSD negative, were tested using the different techniques and the sensitivity calculated. The effect of different concentrations of template DNA in the clinical sensitivity of conventional and real-time techniques was also determined. Five DNA concentrations (50, 100, 150, 300 and 600 ng per reaction) were tested. Additionally, the clinical sensitivity of qPCR with TaqMan and FAM-BHQ1 were evaluated under low template DNA amounts per reaction (10, 50, 100 and 150 ng). All analyses were performed in triplicate.

Fisher's Exact Test was applied to determine statistical differences among sensitivity of distinct diagnostic methods evaluated. All analysis was performed using SAS Statistical Software STAT Version 6.12 (SAS Institute Inc., USA). A *P* value of 0.05 or less was considered statistically significant. Similar optimization results for qPCR with different probes were obtained. Best results were verified with primers and probe concentrations of 90 and 25 pmol, respectively. Optimized TaqMan and FAM-BHQ1 reactions promoted higher correlation coefficient (1.0) for standard curves and better slope factor (-3.45 and -3.42) than previously described TaqMan qPCR (0.99 and -3.19) (Durand and Lightner, 2002). In addition, these reactions generated lower Cq standard deviation (SD) among dilution replicas (data not show). The analytical sensitivity of different methods were 208 plasmid copies for one step PCR, and

approximately 2 copies for two step PCR and optimized qPCR techniques. For standard curves, there were no differences in analytical sensitivity between qPCR reactions with distinct probes (TaqMan or FAM-BHQ1).

Clinical sensitivity of different methods applied was roughly affected by the template DNA concentrations used. The results for 15 positive WSSV samples evaluated are presented in table 1. All methods showed high specificity, with only one false positive result for optimized TaqMan qPCR. Conventional PCR methods showed large intra-sample variation in the diagnostic results when low amount of template DNA (> 100 ng per reaction) was used. Thus, the clinical sensitivity for 50 ng reactions could not be calculated. qPCR assays with 50 and 100 ng of template DNA showed to be statistically superior to one step ($P < 0.0001$) and two steps PCR ($P = 0.021$). In contrast, high DNA concentrations (300 and 600 ng) generated better sensitive results for one ($P = 0.001$) and two steps PCR ($P < 0.0001$) compared with real-time methods. Positivity of 100% was obtained with two steps PCR using 300 and 600 ng of template DNA. The presence of high amount of DNA promoted an inhibitory effect in qPCR reactions with TaqMan and FAM-BHQ1. They presented negative results for all 15 positive WSD strains, when template DNA concentrations overcame 150 ng per reaction. For this concentration (150 ng), two steps PCR showed the best result ($P = 0.008$) and no statistical difference were observed between one step PCR and FAM-BHQ1 qPCR ($P = 0.5$).

The performance of different probes (TaqMan and FAM-BHQ1) in diagnostic qPCR assays was addressed. Significant differences were observed in lowest (10 ng DNA) and highest (150 ng) DNA concentrations tested. FAM-BHQ1 qPCR presented sensitivity of 100% ($P < 0.0001$) and 60% ($P = 0.003$) for reactions with 10 ng and 150 ng of template DNA, respectively. Moreover, they were higher and statistically significant compared to optimized TaqMan (60% and 6.66%) results. There was no significant difference ($P > 1.00$)

between the performance of optimized TaqMan and FAM-BHQ1 in 50 and 100 ng DNA reactions (100% sensitivity). However, lower averages C_q for the major of tested samples were obtained with FAM-BHQ1 reaction. That assay did not present any false positive as verified for optimized TaqMan.

The present study was able to standard and to optimize a FAM-BHQ1 qPCR protocol, and to compare its performance with conventional and real-time PCR methods to diagnose WSSV in clinical samples. The analytical sensitivity of two steps PCR and qPCR techniques was similar to described early (5, 10, 11, 17). In contrast, the one step PCR presented contradictory to the parameter reported in OIE Manual (13). Our data for one sep PCR is in accordance with previous publications of Sritunyalucksana et al. (17) and Nunan and Lightner (11). Since that reaction was recommended in 1990, PCR technologies and reagents have been submitted to a continuous process of quality improvements (11). Therefore, those advances might allow better results with same protocols, achieved with the use of improved reagents, as verified here and previously (11, 17).

The clinical sensitivity of distinct PCR techniques was highly affected by template DNA amount used in the reactions. Two steps PCR presented best sensitivity results for reactions with higher concentrations of shrimp DNA (> 150 ng). In contrast, FAM-BHQ1 qPCR showed best performance with low DNA concentrations (<150 ng). Those reactions presented the same analytical sensitivity, being able to detect plasmid 2 copies. However, for two steps PCR and samples with low target concentration (positive in FAM-BHQ1 reactions), the total shrimp DNA decreases its sensitivity. In spite of the recommended DNA concentration range from 100 ng to 300 ng for two steps PCR (13), an abrupt reduction in sensibility was verified when 100 ng were used. Lo et al. (10) described 100 ng of DNA as the optimal template concentration for that assay, but, the methodology used to determine that was not presented. Thus, the

information accuracy of that cannot be evaluated. Herein, 100% of sensitivity was obtained with DNA levels of 150, 300 and 600 ng, suggesting that the recommended range of template concentration in two steps PCR is slightly higher at minimum level (150 ng). In addition, the DNA amount can securely overcome the maximum level of 300 ng (until 600 ng) without sensitivity loss; however, unspecific amplicons can be verified. High DNA concentrations (> 150 ng) promoted an inhibitory effect in real-time PCR protocols. This phenomenon has been already described by qPCR reactions with total template DNA of other marine invertebrates. The potential inhibitors can be extracted together with nucleic acids, as well as, high concentrations of DNA of those animals can directly inhibit real-time PCR reactions, in a concentration-dependent way (14).

TaqMan and FAM-BHQ1 qPCR protocols presented higher clinical sensitivity when 50 and 100 ng of total shrimp DNA was used. These could be valuable tools, mainly to diagnose WSD in larvae and postlarvae shrimp. Those specimens usually present low viral loads and the total amount of DNA obtained can be reduced (9); that combination increases the possibility of false negative results, when conventional PCR techniques are applied. Therefore, qPCR protocols can solve this problem, allowing to detect WSSV in young animals; the main kinds of shrimp transported between the farms.

Different performances were observed in qPCR sensitivity with TaqMan and FAM-BHQ1 probes for WSSV detection. TaqMan are dual-labeled hydrolysis probes constituted of the fluorophore FAM in 5' extremity and the fluorescent quencher TAMRA at 3' (4). TAMRA fluoresces; whereas Black Hole Quencher 1 (BHQ1) is a dark quencher, which re-emits its energy as heat rather than light (18). The background fluorescence of TAMRA may reduce the sensitivity of qPCR assays (4, 18). This behavior was verified for the tested WSSV qPCR reactions. TaqMan assay had overall worst results than reactions using FAM-BHQ1 probes. FAM-BHQ1 qPCR promoted lower intra-assay

variation and C_q for tested samples. Similar results were found by Yang et al (18) evaluating the performance of TaqMan and BHQ1 quenched probes to detect viral and bacterial respiratory pathogens. FAM-BHQ1 qPCR for WSSV detection showed a constant 100% clinical sensitivity in reactions within the recommended range of DNA concentrations (10-100 ng per reaction). In contrast, TaqMan qPCR presented a significant sensitivity decrease in reactions with low DNA amount (10 ng). Those data clarify the advantages of standardized FAM-BHQ1 qPCR in comparison to TaqMan assay.

In conclusion, the standardized FAM-BHQ1 qPCR protocol showed to be a fast, robust and viable tool to diagnose WSSV in clinical samples. It could be used as an alternative to two steps PCR, mainly to diagnose WSD in larvae and postlarvae shrimp.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq Grant 578767/2008-2, Ministry of Fisheries and Aquacultures and by National Institute for Science and Technology INCT/CNPq/UFGM (573899/2008-8). Carlos A. G. Leal fellowship was provided by CNPq (Grant 158671/2010-4).

REFERENCES

1. Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.
2. Bustin, S.A., 2010. Why the need for qPCR publication guidelines? The case for MIQE. *Methods* 50, 217-226.

3. Chou, P.; Lin, Y.; Teng, P.; Chen, P.; Lee, P. (2011). Real-time target-specific detection of loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus using fluorescence energy transfer-based. *J. Virol. Methods* 173, 67–74.
4. Daum, L.T.; Ye, K.; Chambers, J.P.; Santiago, J.; Hickman, J.R.; Barnes, W.J.; Kruzelock, R.P.; Atchley, D.H. (2004). Comparison of TaqMan and Epoch Dark Quenchers during real-time reverse transcription PCR. *Mol. Cellular Probes* 18, 207–209.
5. Durand, S.V.; Lightner, D.V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.* 25, 381–394.
6. Durand, S.V.; Redman, R.M.; Mohny, L.L.; Tang-Nelson, K.; Bonami, J.R.; Lightner, D.V. (2003). Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSD. *Aquaculture* 213, 9–18.
7. Escobedo-Bonilla, C.M.; Alday-Sanz, V.; Wille, M.; Sorgeloos, P.; Pensaert, M.B.; Nauwynck, H.J. (2008). A review of the morphology, molecular characterisation, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.* 31 1–18.
8. Ishii, T.; Sootome, H.; Shan, L.; Yamashita, K. (2007). Validation of universal conditions for duplex quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Anal. Bioch.* 362, 201–212.
9. Jang, I.; Meng, X.; Seo, H.; Cho, Y.; Kim, B.; Ayyaru, G.; Kim, J. (2009). A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstock and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 287, 40–45.
10. Lo, C.F.; Ho, C.H.; Peng, S.E.; Chen, C.H.; Hsu, H.C.; Chiu, Y.L.; Chang, C.F.; Liu, K.F.; Su, M.S.; Wang, C.H.; Kou, G.H. (1996). White spot

- syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crab and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.* 27, 215–225.
11. Nunan, L.M.; Lightner, D.V. (2011). Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods* 171, 318-321.
 12. Office International des Epizooties-OIE (1997). *Aquatic Animal Health Code*, 1997 Edition. OIE, Paris.
 13. Office International des Epizooties-OIE (2009). *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases*, 6th edition. OIE, Paris.
 14. Pan, M.; McBeath, A.J.A.; Hay, S.J.; Pierce, G.H.; Cunningham, C.O. (2008). Real-time PCR assay for detection and relative quantification of *Liocarcinus depurator* larvae from plankton samples. *Mar. Bio.* 153, 859–870.
 15. Samanman, S.; Kanatharana, P.; Chotigeat, W.; Deachamag, P.; Thavarungkul, P. (2011). Highly sensitive capacitive biosensor for detecting white spot syndrome virus in shrimp pond water. *J. Virol. Methods* 173, 75–84.
 16. Sánchez-Martínez, J.C.; Aguirre-Guzmán, G.; Mejía-Ruíz, H. (2007). White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. *Aquaculture Res.* 122, 1–15.
 17. Sritunyalucksana, K.; Srisala, J.; McColl, K.; Nielsen, L.; Flegel, T.W. (2006). Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture* 255, 95–104.
 18. Yang, G.P.; Erdman, D.D.; Tondella, M.L.; Fields, B.S. (2009). Evaluation of tetramethylrhodamine and black hole quencher 1 labeled probes and five commercial amplification mixes in TaqMan® real-time RT-PCR assays for respiratory pathogens. *J. Virol Methods* 169, 288-290.

Table 1 Clinical sensitivity of conventional and qPCR methods to diagnose 15 positive WSSV samples under different amounts of template DNA

Method	Clinical Sensitivity (%)				
	50 ng*	100 ng*	150 ng*	300 ng*	600 ng*
One step PCR	NC	26.66	53.33	53.33	53.33
Two steps PCR	NC	66.66	100	100	100
TaqMan qPCR	100	100	6.66	0	0
FAM-BHQ1 qPCR	100	100	60	0	0

*DNA; NC: not calculated

ARTIGO 2

SHORT COMMUNICATION

**Duplex real-time PCR for detection of WSSV and IHHNV infections in
cultivated shrimp**

**(Artigo preparado de acordo com as normas da revista “Journal of
Virological Methods”)**

C. A. G. Leal¹; A. C. Cottorello²; R. C. Leite¹; H. C. P. Figueiredo^{1*}.

¹AQUAVET- Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Federal University of
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

²LANAGRO- National Animal and Plant Laboratory, Ministry of Agriculture
(MAPA), Pedro Leopoldo, MG, Brazil.

***Corresponding Author. Mailing Address:** AQUAVET- Laboratory of Aquatic
Animal Diseases, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG,
Brazil. 30123-970.; Tel.: +55 31 34092126, Fax: +55 31 3409 2080; E-mail:
henrique@dmv.ufla.br

ABSTRACT

This work describes a duplex real-time PCR (qPCR), with probes containing non-fluorescent quencher, to detect single and co-infection cases of white spot shrimp virus (WSSV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in cultivated whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The duplex qPCR was standardized and optimized with previously described primers and probes. The performance of two commercial kits, TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) and QuantiTect Virus (Qiagen), was also evaluated. The duplex qPCR was successfully standardized, and there were no differences in the analytical and clinical sensitivities in comparison with its singleplex counterparts, for both viruses. The use of QuantiTect Virus kit improved significantly the clinical sensitivity of single and duplex assays. The developed duplex qPCR protocol was able to identify simultaneously the presence of WSSV and IHHNV in DNA samples of symptomatic and asymptomatic (for one disease) shrimps. High frequency of WSSV/IHHNV co-infection cases was verified; it seems to be a common issue in shrimp cultivated in Brazil. The duplex WSSV/IHHNV qPCR with QuantiTect Virus kit showed to be fast, sensible, and specific, being a valuable tool to survey and diagnose WSSV and IHHNV single and co-infection cases in whiteleg shrimp.

Keywords: co-infection, clinical sensitivity, *Litopenaeus vannamei*, qPCR.

Currently, white spot shrimp virus (WSSV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) are considered one of the principal viral pathogens for penaeid shrimp farming worldwide (He and Xu, 2011). The WSSV outbreaks in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farms are characterized for high mortality rates, reaching until 100% in 3-10 days (Escobedo-Bonilla et al., 2008; Lightner et al., 2011). In contrast, IHHNV is associated with a chronic disease in this shrimp species, named runt deformity

syndrome (RDS). RDS causes cuticular deformities and retarding growth, leading to lower production efficiency and reducing market value by 10 to 50% (He and Xu, 2011; Lightner, 2011). Several diagnostic methods such as histological examination, electron microscopy, *in situ* hybridization and PCR methods have been developed for WSSV (Durand and Lightner, 2002; Chou et al., 2011; Samanmana et al., 2011) and IHHNV (Xie et al., 2008; Teixeira et al., 2010). Real-time PCR (qPCR) assays have been developed to diagnose WSSV (Durand and Lightner, 2002; Chou et al., 2011) and IHHNV (Dhar et al., 2001; Yue et al., 2006). This technique is considered the most sensitive assay for the detection of shrimp viruses (Mrotzek et al., 2010). The development of duplex qPCR allows the simultaneous detection of two viruses in the same reaction, which is more cost-effective than assaying for each virus separately (Tang and Lightner, 2011).

The aim of this study was to standard a duplex qPCR for simultaneous detection of WSSV and IHHNV in clinical samples of diseased whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). In addition, to evaluate the performance of TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) and QuantiTect Virus (Qiagen) in the clinical sensitivity of qPCR.

Diseased and healthy *Litopenaeus vannamei* were collected during outbreaks of WSSV and IHHNV in different shrimp farms, located in two Brazilian States (Santa Catarina and Bahia), between 2004 and 2009. The samples were ethanol 96% preserved and immediately conducted to LANAGRO- National Animal and Plant Laboratory of Brazilian Ministry of Agriculture, situated in Pedro Leopoldo, Minas Gerais State. Eleven WSSV positive, seven IHHNV positive and eight virus negative shrimp samples were evaluated in this study. WSSV and IHHNV positive shrimps showed clinical signs of white spot disease (WSD) and RDS, respectively, and the diagnosis was confirmed by recommended tests (OIE, 2009). The total shrimp DNA was

extracted from three left abdominal pleopods of each shrimp, using the commercial kit Wizard[®] DNA Genomic Purification (Promega, USA). The amount of extracted DNA was quantified spectrophotometrically with GE NanoVue[®] Spectrophotometer (GE Healthcare, UK). The DNA samples were stocked at -20°C until use. Purified plasmids containing the WSSV genomic sequence U50923 and IHHNV sequence AF21826 were used as positive controls. They were serially 10-fold diluted to standard curve construction in qPCR analysis. Six plasmid dilutions were used to determine the sensitivity of different assays. The amount of plasmid copies ranged from 2 to 2×10^5 . The primers and probes used in this work were previously describe (Tang and Lightner, 2001; Durand and Lightner, 2002). All primers used were acquired from Integrated DNA Technologies (IDT, USA). The WSSV hydrolyze probe was labeled with 6-carboxy-fluorescein (FAM) at the end 5' and dark quencher BHQ1 at the 3' end. The IHHNV hydrolyze probe was labeled with dichloro-dimethoxyfluorescein (JOE) at the end 5' and dark quencher BHQ1 at the 3' end. The probes were provided by Sigma-Aldrich.

For duplex qPCR standardization, a set of standard curves was created using six dilutions of control plasmid. To determine the best primer-probe concentration for each reaction individually and for duplex qPCR, the primers were evaluated at concentrations ranging from 5 to 100 pmol and probes varied from 5 to 75 pmol per reaction. The standard curves were evaluated in triplicate for each qPCR mixture tested. The best reaction was determined based in: slope factor (-3.099 to -3.59) (corresponding to PCR efficiency of 90 to 110%); correlation coefficient (above 0.99); and lower average quantification cycle (Cq) for each dilution (Ishii et al., 2007). To evaluate the potential of cross-interaction of WSSV or IHHNV template DNA on duplex qPCR, a 6 x 6 checkerboard validation scheme was established. It could effectively monitor reaction results

and inhibitory effect when concentrations of template DNA (control plasmid) ranged between 2 to 2×10^5 compared with the singleplex reactions.

The clinical sensitivity of duplex qPCR to detect WSSV and IHHNV single and co-infection cases was addressed, and compared to singleplex reactions for each virus. For this, eleven WSSV and seven IHHNV positive shrimp DNA samples were tested. The specificity was evaluated using eight virus negative samples. The performance of either the QuantiTect Virus kit (Qiagen, USA) and the Universal Master Mix (Applied Biosystems, USA) were also evaluated. They were tested in accordance with manufacturer's recommendations. Singleplex and duplex qPCR were conducted in a total volume of 25 μ L with standardized concentrations for each primer sets and for the specific probes, and 50 ng of total shrimp DNA. Detection of PCR products was performed with the ABI 7500 system under the following profiles. For the QuantiTect Virus kit, reaction mixtures were incubated at 95° C for 15 min to activate hot-start Taq polymerase followed by subjection to a two-step PCR protocol (denaturation for 1 min at 94° C followed by a combined annealing–extension step (with fluorescent data acquisition) for 1 min at 60° C). For the TaqMan Universal Master Mix, the profile was the same as that of the QuantiTect Virus kit, except for the activation condition of hot-start Taq polymerase (95° C for 10 min) and the cycle denaturation step (95° C for 15 s). Data acquisition and analysis were performed using 7500 Software Version 2.0 (Applied Biosystems) under standardized reaction with ROX signal. The qPCR data were evaluated and presented according to MIQE guidelines (Bustin et al., 2009; Bustin, 2010). Fisher's Exact Test was applied to determine statistical differences among sensitivity of single and duplex qPCR methods evaluated, as well as, the results with the different qPCR kits. All analyses were performed using SAS Statistical Software STAT Version 6.12 (SAS Institute Inc., USA). A *P* value of 0.05 or less was considered statistically significant.

A duplex qPCR to detect WSSV and IHHNV in clinical samples of diseased whiteleg shrimp was standardized. The best primer-probe concentrations found for both, singleplex (WSSV and IHHNV qPCR) and duplex reaction were 95 pmol of primer and 25 pmol of probe of each set. The results of the experiments showed that there was no difference in the amplification of standard curves when comparing the duplex assay with the singleplex reactions. Mean (n= 3) PCR efficiency results obtained for the singleplex (WSSV= 91%; IHHNV= 90%) and duplex formats (WSSV= 91%; IHHNV= 101%) with TaqMan Universal Master Mix are in the optimal recommended range, as well as, that verified for reactions with QuantiTect Virus (singleplex WSSV = 96%, and IHHNV = 98%; duplex- WSSV = 109%, and IHHNV = 109%). The use of different kits did not affect the standard curve data for single and duplex reactions. The detection limits for the duplex and individual assay formats were the same, being two copies for WSSV control plasmid and 20 copies for IHHNV control plasmid.

The potential cross-interaction of different DNA template and its interference in PCR efficiency were evaluated by a 6 x 6 checkerboard analysis. The amplification plots of WSSV and IHHNV control plasmid were not altered by the presence of counterpart targets at concentrations between 2 and 2×10^4 . At highest IHHNV plasmid concentration (2×10^5 copies) the detection limit of WSSV plasmid increased from two to 20 copies. In contrast, the presence of WSSV plasmid did not affect the detection limit of IHHNV plasmid, independently of its concentration.

The duplex format presented equal clinical sensitivity and specificity results to its respective counterpart's singleplex reactions, with just one divergent data (table 1). One IHHNV sample, positive in singleplex reaction with QuantiTect, showed negative result in duplex qPCR with same kit. Sixteen of seventeen samples previously positive for WSSV or IHHNV by PCR were

detected by standardized duplex qPCR. The use of different kits directly influenced the performance of the assays. The Cq values obtained for clinical samples with distinct assays ranged as following: WSSV singleplex- TaqMan 29.70 to 36.16 (Average SD Intra-sample= 0.19 ± 0.12), QuantiTect 28.83 to 34.69 (0.2 ± 0.16); IHHNV singleplex- TaqMan 32.64 to 34.5 (0.19 ± 0.03), QuantiTect 29.17 to 35.73 (0.25 ± 0.13); Duplex WSSV- TaqMan 32.05 to 37.53 (0.22 ± 0.16), QuantiTect 28.53 to 35.9 (0.21 ± 0.09); and Duplex IHHNV- TaqMan 32.05 to 37.53 (0.22 ± 0.16), QuantiTect 29.78 to 35.9 (0.21 ± 0.09). In general, lower Cq values were observed for single and duplex reactions with QuantiTect. For WSSV singleplex reaction, this kit promoted an average reduction of 2.38 in Cq values for 11 tested samples. Likewise, a 2.99 average decreasing in Cq values was observed in IHHNV singleplex. Duplex qPCR with QuantiTect presented 3.79 and 3.52 lower Cq averages, respectively for WSSV and IHHNV positive samples. The QuantiTect Virus kit significantly ($P < 0.05$) increased the sensibility of singleplex and duplex qPCR reactions. It was pronounced in IHHNV detection, when singleplex positivity increased from 33.33% with TaqMan to 100% and duplex from 33.33% to 83.33%. The duplex qPCR was able to detect natural cases of WSSV and IHHNV co-infection in whiteleg shrimp. Ten co-infected samples were found, being five initially diagnosed just as WSSV positive and five as IHHNV positive.

A duplex qPCR was standardized with primers and probes previously described and validated for WSSV and IHHNV detection (Durand and Lightner, 2002; Tang and Lightner, 2001). The specificity and sensibility of previous single reactions were associated in optimized duplex condition, creating a feasible duplex qPCR. This approach was successfully able to detect both viral infections in clinical samples of diseased whiteleg shrimp, in single and co-infection cases. The simultaneous identification of WSSV and IHHNV present a

practical usefulness, since these viruses commonly causes mixed infections in shrimp (Yang et al., 2006; Xie et al., 2008).

The clinical sensitivity and specificity of the duplex qPCR were equal to their singleplex WSSV and IHHNV reactions, as well as, similar to previous records (Durand and Lightner, 2002; Tang and Lightner, 2001). The detection limit of duplex qPCR for IHHNV was similar to previously reported for a real-time multiplex PCR (Xie et al., 2008). However, the duplex real-time assay was able to detect IHHNV in samples with 10.000 and 627 times lower amounts of target DNA, than conventional duplex and multiplex PCR (Khawsak et al., 2008; Yang et al., 2006). The detection limit for WSSV presented by duplex method was 1.000 times lower than obtained with a duplex PCR (Yang et al., 2006) and with a six virus multiplex PCR technique (Khawsak et al., 2008). In addition, it was 10.000 copies lower than the limit of a multiplex real-time PCR prior developed (Xie et al., 2008). These data argue the superior performance of standardized duplex qPCR standardized in comparison to other conventional and real-time methods. In addition, the lower detection limit of duplex reaction makes it an advantageous tool to detect the viruses in problematic samples, such as shrimp larvae and post-larvae. Those specimens usually present low viral loads and the total amount of DNA obtained can be reduced (Jang et al., 2009); what could promote false negative results with the use of other techniques cited before.

In the present study, the effect of different real-time PCR commercial kits on qPCR clinical sensitivity was evaluated. The QuantiTect Virus improved substantially the performance of single and duplex qPCR reactions, mainly for IHHNV detection. This kit contains a synthetic factor and an optimized combination of KCl and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in its buffer, which promotes specific and stable annealing of primers to templates. Positive results were also obtained for quantification of mouse genes expression, using a similar kit, in duplex and

fourplex qPCR reactions (Ishii et al., 2007; Ishii et al., 2009). In contrast, this promoted poor results when used in qPCR reaction to detect Ebola virus (Stephens et al., 2010).

The duplex qPCR identified ten shrimp samples simultaneously positive for WSSV and IHHNV. In all cases, the animals presented clinical signs of just one disease, but presented mixed infections. Yang et al. (2006) firstly described WSSV/IHHNV co-infection in *Litopenaeus vannamei*, detected by duplex PCR. Xie et al. (2008) using a real-time multiplex PCR, found one co-infected shrimp sample in 15 evaluated. Our results demonstrated higher frequency of WSSV/IHHNV co-infection cases than previously reported. It can be attributed to the superior performance of duplex qPCR standardized, in comparison to the other methods. Also, the frequency of natural co-infection in Brazilian shrimp farms could be higher than from other countries. This phenomenon was demonstrated for IMNV and IHHNV mixed infections, when a survey verified the high occurrence of this in whiteleg shrimp cultivated in Northeast Brazil (Teixeira-Lopes et al., 2011).

In conclusion, the duplex qPCR with QuantiTect Virus kit proved to be a robust and feasible survey and diagnostic tool to detect WSSV and IHHNV, single and co-infection cases in whiteleg shrimp.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq Grant 578767/2008-2, Ministry of Fisheries and Aquacultures and by National Institute for Science and Technology INCT/CNPq/UFGM (573899/2008-8). Carlos A. G. Leal fellowship was provided by CNPq (Grant 158671/2010-4).

REFERENCES

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.
- Bustin, S.A., 2010. Why the need for qPCR publication guidelines? The case for MIQE. *Methods* 50, 217-226.
- Chou, P., Lin, Y., Teng, P., Chen, P., Lee, P., 2011. Real-time target-specific detection of loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus using fluorescence energy transfer-based. *J. Virol. Methods* 173, 67-74.
- Dhar, A.K., Roux, M.M., Klimpel, K.R., 2001. Detection and quantification of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using Real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2835-2845.
- Durand, S.V., Lightner, D.V., 2002. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.* 25, 381-394.
- Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., 2008. A review of the morphology, molecular characterisation, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.* 31, 1-18.

He, L., Xu, H., 2011. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Aquaculture* 311, 94–99.

Ishii, T., Sootome, H., Shan, L., Yamashita, K., 2007. Validation of universal conditions for duplex quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Anal. Bioch.* 362, 201–212.

Ishii, T., Sootome, H., Shan, L., Yamashita, K., 2009. Practical evaluation of universal conditions for four-plex quantitative PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 271–278.

Jang, I., Meng, X., Seo, H., Cho, Y., Kim, B., Ayyaru, G., Kim, J., 2009. A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstock and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 287, 40–45.

Khawsak, P., Deesukon, W., Chaivisuthangkura, P., Sukhumsirichart, W., 2008. Multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of six viruses of penaeid. *Mol. Cel. Probes* 22, 177–183.

Lightner, D.V., 2011. Virus diseases of farmed shrimp in Western Hemisphere (the Americas): A review. *J. Invert. Pat.* 106, 110-130.

Mrotzek, G., Haryanti, Koesharyani, I., Tretyakov, A.N., Sugama, K., Saluz, H.P., 2010. Fast short-fragment PCR for rapid and sensitive detection of shrimp viruses. *J. Virol. Methods* 168, 262–266.

Office International des Epizooties-OIE, 2009. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases, 6th edition. OIE, Paris.

Samanmana, S., Kanatharana, P., Chotigeat, W., Deachamag, P., Thavarungkul, P., 2011. Highly sensitive capacitive biosensor for detecting white spot syndrome virus in shrimp pond water. *J. Virol. Methods* 173, 75–84.

Stephens, K.W., Hutchins, R.J., Dauphin, L.A., 2010. Cross-platform evaluation of commercial real-time reverse transcription PCR master mix kits using a quantitative 5'nuclease assay for Ebola virus. *Mol. Cel. Probes* 24, 370–375.

Tang, K.F.J., Lightner, D.V., 2001. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Organ.* 44, 79–85.

Tang, K.F.J., Lightner, D.V., 2011. Duplex real-time PCR for detection and quantification of monodon baculovirus (MBV) and hepatopancreatic parvovirus (HPV) in *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Organ.* 93, 191–198.

Teixeira, M.A., Cruz, J.E.F., Vieira, P.R.N., Branco, I.R.C., Costa, F.H.F., Rádis-Baptista, G., 2010. Differential diagnosis of active hypodermal and hematopoietic necrosis virus based on gene choice and reverse transcription coupled with PCR. *Gen. Mol. Res.* 9, 2025–2031.

Teixeira-Lopes, M.A., Vieira-Girão, P.R.N., Freire, J.E.C., Rocha, I.R.C.B., Costa, F.H.F., Rádis-Baptista, G., 2011. Natural co-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and infectious myonecrosis virus (IMNV) in *Litopenaeus vannamei* in Brazil. *Aquaculture* 312, 212–216.

Xie, Z., Xie, Z., Xie, L., Pang, Y., Lu, Z., Xie, Z., Sun, J., Deng, X., Liu, J., Tang, X., Khan, M., 2008. Development of a real-time multiplex PCR assay for detection of viral pathogens of penaeid shrimp. *Arch. Virol.* 153, 2245-2251.

Yang, B., Song, X., Huang, J., Shi, C., Liu, Q., Liu, L., 2006. A single-step multiplex PCR for simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *J. Fish Dis.* 29, 301–305.

Yue, Z.Q., Liu, H., Wang, W., Lei, Z.W., Liang, C.Z., Jiang, Y.L., 2006. Development of real-time polymerase chain reaction assay with TaqMan probe for the quantitative detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus from shrimp. *J. AOAC Int.* 89, 240–244.

Table 1 Clinical sensitivity results of singleplex and duplex qPCR with different commercial kits for detection of WSSV and IHHNV in clinical samples

Sample*	Singleplex (Sensitivity %)		Duplex (Sensitivity %)		Co-infection (Duplex qPCR)	
	TaqMan	QuantiTect	TaqMan	QuantiTect	TaqMan	QuantiTect
WSSV positive (n =11)	9 (81.81)	11 (100)	9 (81.81)	11 (100)	4	5
IHHNV positive (n = 7)	2 (33.33)	7 (100)	2 (33.33)	6 (83.33)	2	5
Negative	0	0	0	0	0	0

* the samples were previously diagnosed just for one disease

ARTIGO 3

ORIGINAL RESEARCH

Development of real-time PCR for the diagnosis of fish pathogenic *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*

(Artigo preparado de acordo com as normas da revista “Veterinary Microbiology”)

C. A. G. Leal; F. A. A. Costa; R. C. Leite; H. C. P. Figueiredo*.
AQUAVET- Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Federal University of
Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

***Corresponding Author. Mailing Address:** AQUAVET- Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil. 30123-970.; Tel.: +55 31 34092126, Fax: +55 31 34092080.; E-mail: henrique@dmv.ufla.br

Abstract

Several *Streptococcus* species have been associated with outbreaks in fish farms worldwide. In Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture, *S. agalactiae* is considered an emergent pathogen in the major country producers. *S. dysgalactiae* was recently described as tilapia pathogen. The lack of rapid, accurate, and reliable tools is one of the main limitations to streptococcosis management. In this regard, the real time PCR provides a valuable alternative means, being more sensible, specific, and fast. The aim of this work was to develop a real-time PCR to diagnose *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* infections in Nile tilapia. Primers and probes were designed for the targets *cfb* gene and *sodA*, respectively for *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*. The reactions were standardized in singleplex and duplex format. Nile tilapia fingerlings were experimentally infected with *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*. Samples of brain, kidney, liver, spleen, muscle and gill were collected and submitted to bacteriology, PCR and developed real-time PCR (qPCR). The developed qPCR presented low detection limit, being approximately of 61 cells (genome equivalents) for *S. agalactiae* and 154 cells for *S. dysgalactiae*. The clinical sensitivity of duplex qPCR for *S. agalactiae* was 90%, significantly higher than bacteriology (50%) and PCR (63.3%). Better results were obtained for *S. dysgalactiae* qPCR in comparison with bacteriology and PCR, showing sensitivities of 96.67%, 46.67% and 23.3%. The developed duplex real-time PCR presented high sensitivity and to be faster than other tested assays, being a valuable tool to diagnose *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* infections in Nile tilapia.

Keywords: clinical sensitivity, qPCR, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, tilapia.

1. Introduction

The bacteria of *Streptococcus* genus are widely known etiologic agents of diseases in several animal species (Agnew and Barnes, 2007; Sorensen et al., 2010). In the last decades, these pathogens have been associated with illness in wildlife and cultivated aquatic animals (Nomoto et al., 2004; Agnew and Barnes, 2007; Mian et al., 2009). Currently, the streptococcosis reached the position of global emergent diseases for marine and freshwater fish farming. There is no official data, but the estimation of economic losses caused by *Streptococcus* outbreaks overcome millions of dollars annually (Austin and Austin, 2007; Romalde et al., 2008).

Two *Streptococcus* species have been well described as Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens, *S. iniae* and *S. agalactiae* (Evan et al., 2002; Agnew and Barnes, 2008; Mian et al., 2009). Recently, a third species, *S. dysgalactiae* were reported as etiologic agent of outbreaks in Brazilian farms (Nobrega-Netto et al., 2011).

The diagnosis of warm-water streptococcosis are usually performed by culture-based methods, following biochemical and molecular tests for bacterial identification (Mata et al., 2004; Nomoto et al., 2008; Mian et al., 2009; Nobrega-Netto et al., 2011). PCR techniques have been developed to identify *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* (Hassan et al., 2003; Mata et al., 2004; Nomoto et al., 2008). However, these procedures can be costly and time consuming, since gel based visualization and individual PCR assays have to be performed (Mata et al., 2004). In addition, the clinical sensitivity of those methods are usually lower than real-time PCR assays (Mackay, 2004). Currently, there are no real-time PCR with hydrolyzes probes available to identify *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*, as well as, to diagnose *Streptococcus* infections in Nile tilapia.

The aim of this work was to develop a real-time PCR to diagnose *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* infections in Nile tilapia. In addition, the clinical sensitivity of bacterial isolation, PCR and qPCR was comparatively evaluated.

2. Material and Methods

2.1 Bacteria

The strains *Streptococcus agalactiae* SA20-06 (Mian et al., 2009), and *Streptococcus dysgalactiae* SD64-07 (Nobrega-Netto et al., 2011) were used for real-time PCR standardization and experimental infection trials. The strains were previously isolated from diseased Nile tilapia, and identified by biochemical and molecular methods (Mian et al., 2009; Nobrega-Netto et al., 2011). These isolates are part of AQUAVET bacterial culture collection. The reference isolate *S. agalactiae* NEM316 was used during qPCR standardization as quality control. They were stored at -76°C until use.

2.2 DNA extraction

The DNA extraction was performed with DNeasy Tissue and Blood kit (Qiagen, Germany). For bacterial DNA isolation, the strains were thawed, spread onto 5% SBA and incubated at 28°C for 48 h. The pure bacterial cultures were harvested, and DNA extracted according to manufacturer's recommendations. For total DNA extraction of Nile tilapia tissues and associated bacterial DNA, samples of brain, liver, kidney, spleen, muscle, and gill were aseptically collected, weighed (20 mg), blended with 180 µL of ATL buffer, and mechanically disrupted with sterile pestle. Afterwards, 20 µL of proteinase K stock solution was added, mixed, and incubated at 56°C until the samples were completely lysed (1-2 h). The tubes were incubated at 95°C for 10 min, followed by addition of 20 mg.mL⁻¹ of lysozyme, and incubation at 37°C for 30 min. An additional proteinase K step was performed by addition of 10 µL stock solution, and incubation for 15 min at 56°C. Finally, 200 µL of ethanol (96-100%) was incorporated in the tubes. After that, the extraction procedure was carried out

according to manufacturer's recommendations for "Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)". The amount of extracted DNA was quantified spectrophotometrically with GE NanoVue[®] Spectrophotometer (GE Healthcare, UK). The DNA samples were stocked at -76°C until use.

2.3 Primers and Probes

Real-time PCR (qPCR) primers and probes for detection of *S. agalactiae*, and *S. dysgalactiae*, were designed with Beacon Designer Version 7.9 (PremierByosoft, USA). The selected targets for qPCR were *cfb* gene (CAMP factor), and *sodA* (superoxide dismutase manganese-dependent), respectively, for *S. agalactiae*, and *S. dysgalactiae*. These are specific and conserved in these bacterial species, being valuable targets for qPCR assay. All GenBank available (NCBI, USA) sequences of these genes were aligned with CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) and the core sequence used for primer and probe design. They are presented in the table 1. The specificity of primer and probe sequences was *in silico* tested by BLAST analysis, revealing no significant alignment with other species available in Genbank. The product sizes for *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* qPCR are 147 and 88, respectively. During the standardization the amplicons were sequenced and submitted to BLAST analysis to confirm the specificity of reactions.

All primers used were acquired from Eurofins (France). The hydrolyze probes, SAGA-Probe and SYDS-Probe, were respectively labeled at the end 5' with 6-carboxy-fluorescein (FAM), and N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA). At the 3' end, the probes were labeled with the non-fluorescent quencher, Black Hole Quencher 1(BHQ) and 2. The probes were provided by Sigma-Aldrich.

2.4 qPCR standardization

The qPCR reaction was standardized for primers and probes concentrations, using pure DNA of bacterial strains (*Streptococcus agalactiae*

SA20-06 and *Streptococcus dysgalactiae* SD64-07). The assays were standardized in single and duplex format. The standard curves were individually generated with ten-fold dilution of DNA of each bacterium. The primers were evaluated at concentrations ranging from 5 to 90 pmol and probes varied from 5 to 45 pmol per reaction. The standard curves were evaluated in triplicate for each qPCR mixture tested. The best reaction was determined based in: slope factor (-3.099 to -3.59) (corresponding to PCR efficiency of 90 to 110%); correlation coefficient (above 0.99); and lower average quantification cycle (Cq) for each dilution (Ishii et al., 2007; Ishii et al., 2009). All qPCR assays were performed in an ABI 7500 Real-time System (Applied Biosystems, USA) and TaqMan Universal Master Mix with ROX as passive reference (Applied Biosystems) was used. The qPCR cycling consisted of 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles of 95°C for 60 seconds and 60°C for 60 seconds. Data acquisition and analysis were performed using 7500 Software Version 2.0 (Applied Biosystems) under standardized reaction with ROX signal. The qPCR data were evaluated and presented according to MIQE guidelines (Bustin et al., 2009; Bustin, 2010).

In addition to the *in silico* evaluation of primer and probe sets, the qPCR specificity were addressed through the testing of other Gram positive and negative fish pathogens, such *Streptococcus iniae* ATCC 29178, *Weissella* sp. WS08 (Figueiredo et al., 2011), and *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

2.5 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity (or detection limit) was determined using pure DNA of the strains. Purified genomic DNA of *Streptococcus agalactiae* SA20-06 and *Streptococcus dysgalactiae* SD64-07 were ten-fold serially diluted in sterile water down to the approximate amount of 3 fg.mL⁻¹. One µL of each dilution were used as template in single and duplex qPCR assays.

2.7. PCR

The PCR assays described by Mata et al. (2004) and Hassan et al. (2003) were respectively used to diagnose *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* infections in experimentally infected Nile tilapia fingerlings. 150 ng of total DNA extracted from brain, kidney, spleen, liver, muscle, and gill were applied as template in the reactions. Each sample was analyzed in triplicate. PCR was carried out with GoTaq Flexi DNA Polymerase kit (Promega, USA), and performed in Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems). The primers were provided by Eurofins.

2.8. Challenge assay and clinical sensitivity

Fish were experimentally infected to address the capacity of developed qPCR and other methods to detect *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), as well as, in its different tissues. Nile tilapia fingerlings (mean weight 40.3 ± 9.8 g) were acquired from a commercial hatchery and were kept in a 57-L aquarium supplied with flow-through water. Each experimental group was comprised by five fish. Fish were maintained on a 12:12h light/dark period, water temperature of 26°C and were fed to satiation twice a day with VITAFISH 31% (Matsuda, Brazil). They were acclimated during 10 days before the *in vivo* assays.

The strains SA20-06 and SD64-07 were inoculated in Brain Heart Infusion Broth (BHI) and incubated at 28°C under low agitation for 16-18 h. Bacterial pellets were harvest and washed with PBS (Phosphate buffered saline) pH 7.2. Fish were anesthetized by immersion in a bath containing 10mg/L benzocaine. Fingerlings were inoculated with 0.1ml of bacterial suspensions by intraperitoneal via. The group 1 was injected with 2×10^7 *S. agalactiae* CFU.fish⁻¹. Group 2 was injected with 6×10^7 *S. dysgalactiae* CFU.fish⁻¹. A control group was inoculated with sterile PBS. All *in vivo* experiments were carried out according to animal welfare standards and were approved by the

Ethical Committee for Animal Experiments of the Federal University of Minas Gerais, Brazil.

Challenged fish were monitored five times a day. When died or at 120 hours post infection (hpi), the animals were euthanasiated by benzocaine overdose. Samples of brain, kidney, liver, spleen, muscle and gills were aseptically collected and immediately submitted to bacteriology. The tissues were streaked onto SBA and incubated at 28°C for 72 h. The isolates obtained were identified by biochemical and molecular methods previously described (Mian et al., 2009; Nobrega-Netto et al., 2011).

After that, under aseptic conditions, the tissues were weighed and total DNA extracted as described in the item 2.2. The 150 ng of total DNA samples from different fish and tissues were submitted to PCR and qPCR (singleplex and duplex) to diagnose *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* infections. The threshold value for classifications of samples as positive or negative by the real-time PCR were set to a Cq value of 38, based on analysis of standard curves and analytical sensitivities of qPCR assays. Samples giving a Cq value of ≤ 38 with a sigmoid shape of the analysis curve were classified as positive. Samples with a Cq value > 38 were classified as negative if on re-testing they gave a similar Cq value. The clinical sensitivity of bacteriology, PCR and qPCR were determined and compared between them.

2.9. Statistical analysis

Chi-Square Test was applied to determine statistical differences among the clinical sensitivity of distinct diagnostic methods evaluated. The correlation between Cq values of singleplex and duplex qPCR assays were tested by Mann-Whitney *U*-test. All analysis was performed using SAS Statistical Software STAT Version 6.12 (SAS Institute Inc., USA). A *P* value of 0.05 or less was considered statistically significant.

3. Results

3.1. qPCR standardization and analytical sensitivity

The qPCR assays to detect *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* were successfully standardized. The best primer-probe concentrations found for both, singleplex (*S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* qPCR) and duplex reactions were 95 pmol of primer and 25 pmol of probe. The results of the experiments showed that there were no significant differences in the amplification of standard curves when comparing the duplex assay with the singleplex reactions. Mean (n= 3) PCR efficiency results obtained for the singleplex (*S. agalactiae*= 91%; *S. dysgalactiae*= 90%) are in the optimal recommended range. The duplex formats presented PCR efficiency slightly lower than recommended range (*S. agalactiae*= 88%; *S. dysgalactiae*= 87%). In addition, higher Cq values (mean Cq difference = 0.75) were obtained with duplex reaction. However, those traits did not affect the analytical and clinical sensitivities of the duplex reaction (presented below) and were not statistically significant (Mann-Whitney *U*-test, *P* > 0.05).

There were no differences between analytical sensitivity of singleplex and duplex qPCR for both pathogens. Under conditions of 90 pmol of primer, 25 pmol of probe, and with TaqMan Universal Master Mix, the *S. agalactiae* qPCR showed an analytical sensitivity of 135 fg of DNA. It is equivalent approximately to 61 cells or genome equivalents. In same conditions, *S. dysgalactiae* qPCR presented the detection limit of 340 fg of DNA, equivalent to 154 cells or genome equivalents. There was no difference in the analytical sensitivity between singleplex and duplex reactions.

3.2. Clinical sensitivity

The fish from control group, injected with sterile PBS, presented negative results from all fish and tissues in bacteriology, PCR and qPCR. The qPCR assays were able to detect the presence of *S. agalactiae* and *S.*

dysgalactiae in all fish challenged with these bacteria, and in all tissues evaluated (at least four times).

For the fish group experimentally infected with *S. agalactiae*, the first mortality was observed 17 hpi. The second fish died 96 hpi. The other three fish were euthanized 120 hpi. All fish presented clinical signs of streptococcosis; however, severe symptoms (exophthalmia and erratic swimming) were observed only in those two fish that died. The table 2 presents the results of qPCR, PCR and bacteriology for fish of the group 1. The brain was the only tissue which presented 100% of positivity in the three techniques evaluated. The other organs showed variable degrees of positive results according to method. The qPCR was significantly more sensible than bacteriology ($P = 0.002$) and PCR ($P < 0.0001$) for the diagnostic of *S. agalactiae* in Nile tilapia tissues. There was no significant difference between PCR and bacteriology ($P = 1.0$). The real-time PCR method was able to detect the bacteria in the majority of tissues of all challenged fish; two and three negative results ($n = 30$) in singleplex and duplex qPCR were observed, respectively. They were verified in samples from muscle and gill. There was no direct relation between Cq values and positive results in bacteriological exam and PCR.

There was no significant difference among the clinical sensitivities of singleplex and duplex qPCR ($P = 1.0$). The Cq values obtained with singleplex reaction was lower than (mean Cq difference = 1.03) for duplex assay. However, there was no significant difference in Cq among the two formats (Mann-Whitney U -test, $P > 0.05$), with just one discrepant data observed.

The DNA samples from brain presented lowest mean Cq values (singleplex = 27.164; duplex = 27.88). In contrast, liver, muscle, and gill showed higher Cq values (singleplex = 32.904, 32.9, and 32.904; duplex = 33.366, 34.675, and 32.256). However, those differences were not statistically significant (Mann-Whitney U -test, $P > 0.05$).

In the group two, experimentally challenged with *S. dysgalactiae*, three fish presented severe clinical signs of the disease (darkness, anorexia, lethargy and erratic swimming). They died 56, 72 and 96 hpi, respectively. The other two fish showed slightly symptoms of the illness (darkness and anorexia; fish four) and absence of signs (asymptomatic; fish five). They were euthanized 120 hpi. The table 3 presents the results of qPCR, PCR and bacteriology for the group 2.

The clinical sensitivity of qPCR was significantly higher than bacteriology ($P = 0.006$) and PCR ($P < 0.0001$) for the diagnostic of *S. dysgalactiae* in Nile tilapia tissues. There was no significant difference between bacteriology and PCR ($P = 1.0$). However, PCR presented worst clinical sensitivity results (26.6%). The qPCR was able to detect the bacteria in all infected fish, including in asymptomatic one; three negative results ($n = 30$) in qPCR were observed. They were verified in samples from muscle and liver (one sample). There was no direct relation between Cq values and positive results in bacteriological exam and PCR.

No significant difference was verified among the clinical sensitivities of singleplex and duplex qPCR ($P = 1.0$). There was no significant difference in Cq among the two formats (Mann-Whitney U -test, $P > 0.05$). Discrepant data was not observed among singleplex and duplex assays. Spleen and kidney DNA samples presented lower mean Cq values (singleplex = 30.662, and 31.166; duplex = 31.716, and 31.622). Higher Cq values were obtained for brain and muscle (singleplex = 33.712, and 32.45; duplex = 33.22, and 34.07). Those were not statistically significant (Mann-Whitney U -test, $P > 0.05$).

4. Discussion

Streptococosis is one of the principal health threats for fish farming worldwide, causing high economic losses every year (Austin and Austin, 2007; Romalde et al., 2008). Rapid, accurate and reliable diagnostic tools are fundamental for an effective disease management and on-farm biosecurity

measures (Frans et al., 2008). The real-time PCR has been emerging as a valuable diagnostic tool, and offers as main benefits: reduced time of analysis; increased analytical sensitivity; increased reproducibility; and decreased cross contamination (Caraguel et al., 2011).

In the present work a qPCR to diagnose *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* infections in Nile tilapia was developed. It was standardized in singleplex and duplex format, without sensitivity loss. The reactions were developed with hydrolyze probes containing non fluorescent quencher. This technology improves the qPCR sensitivity, since it promotes low background fluorescence (Daum et al., 2004). The analytical sensitivity of qPCR for *S. agalactiae* was similar to verified for other fish pathogens, like *Lactococcus garviae* and *Francisella noatunensis subsp. orientalis* (Jung et al., 2010; Soto et al., 2010). It was higher than observed for real-time PCR assays for detection of *Renibacterium salmoninarum* and *Flavobacterium columnare* (Panangala et al., 2007; Jansson et al., 2008). In the same way, the present assay was higher sensitive than a previously described qPCR, using hybridization probes, developed to detect *S. agalactiae* in cases of human newborn infections (Golden et al., 2004). For *S. dysgalactiae*, the analytical sensitivity was slightly higher than for *S. agalactiae*, but, similar to verified for *Lactococcus garviae* (Jung et al., 2010). In addition, it was higher than obtained for human pathogen *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* (Dawson et al., 2009). In spite of similar results verified here and previously, the performance of qPCR assays can be affected by several factors, including intrinsic (qPCR chemistry, PCR efficiency, linear dynamic range, limit of detection and precision), and extrinsic characteristics (qPCR reagents, extraction procedures, equipments, data analysis etc.) of reaction (Bustin et al., 2009). Therefore, the direct comparison of distinct protocols may provide some confusing inferences and must be carefully performed.

The duplex qPCR for the diagnostic of *S. agalactiae* showed significantly superior clinical sensitivity than culture-based and conventional PCR for infected Nile tilapia fingerlings. Previous report compared the performance of microbiology, histology, and immunohistochemistry for the diagnostic of *S. agalactiae* in tilapia (*Oreochromis sp.*). Similar to verified here, the bacteriological exam presented worst results, with 30.8% of clinical sensitivity (Hernández et al., 2009). The same team used a nested-PCR assay to detect the bacteria in diseased fish, frozen and paraffin fixed tissue (brain). The authors concluded that nested-PCR is the best method (Jiménez et al., 2011). The duplex qPCR developed showed similar clinical sensitivity to histological methods, and nested-PCR described early (Hernández et al., 2009; Jiménez et al., 2011); it makes this method more affordable. The real-time assay comprises the advantages of reduced time of analysis, high reproducibility, and to be a less laborious approach (no necessity of post PCR revealing). In addition, its use decreases the possibility of cross contamination, a common threat in nested-PCR (Caraguel et al., 2011).

The diagnostic of *S. dysgalactiae* with duplex qPCR also showed ideal results. It was higher sensitive than bacteriology and PCR. This last technique presented the worst result. It was previously standardized to the identification of bacteria from pure cultures (Hassan et al., 2003), which can explain the lower clinical sensitivity of the reaction. In addition, qPCR was able to detect *S. dysgalactiae* infections in asymptomatic tilapia.

Moreover, as duplex qPCR was able to detect low amount of *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* cells in almost all tilapia tissues, it might be a valuable tool to diagnose asymptomatic and convalescent carriers. Currently, the diagnostic tests available just allow to determine the presence of the pathogen in clinically affected animals. This characteristic can be particularly problematic in on-farm control programs. It can allow the introduction of asymptomatic

carriers, transmission of pathogen, and introduction illness in free farms. It may possible that fish *Streptococcus* promote asymptomatic infection through colonization of fish body site like gut, nasal mucosa etc., as verified for other animals (Dawson et al., 2009; Sorensen et al., 2010). The developed qPCR can be applied in future studies of pathogenesis, virulence, and transmission, to address that hypothesis and others about the dynamic of infection of *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* in fish.

In conclusion, the duplex qPCR developed to *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae* detection presented to be a reliable tool to diagnose streptococcosis in Nile tilapia.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq Grant 578767/2008-2, Ministry of Fisheries and Aquaculture and by National Institute for Science and Technology INCT/CNPq/UFGM (573899/2008-8). Carlos A. G. Leal fellowship was provided by CNPq (Grant 158671/2010-4).

REFERENCES

Austin, B., Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish, 4th ed. Springer/Prazis Publishing, Chichester.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin. Chem. 55, 611-622.

Bustin, S.A., 2010. Why the need for qPCR publication guidelines? The case for MIQE. Methods 50, 217-226.

Caraguel, C.G.B., Stryhn, H., Gagné, N., Dohoo, I.R., Hammell, K.L. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23: 2-15.

Daum, L.T., Ye, K., Chambers, J.P., Santiago, J., Hickman, J.R., Barnes, W.J., Kruzlock, R.P., Atchley, D.H., 2004. Comparison of TaqMan and Epoch Dark Quenchers during real-time reverse transcription PCR. *Mol. Cellular Probes* 18, 207–209.

Dawson, E.D., Taylor, A.W., Smagala, J.A., Rowlen, K.L., 2009. Molecular Detection of *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis*. *Mol. Biotechnol.* 42:117-127.

Evans, J.J., Klesius, P.H., Gilbert, P.M, Shoemaker, C.A., Al Sarawi, M., Landsberg, J., Duremdez, R., Al Marzouk, A., Al Zenki, S., 2002. Characterization of β -haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus L.*, and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *J. Fish Dis.* 25: 505–513.

Figueiredo, H.C.P., Costa, F.A.A., Leal, C.A.G, Carvalho-Castro, G.A., Leite, R.C., 2011. *Weissella sp.* outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Brazil. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2011.11.008.

Frans, I., Lievensm, B., Heusdens, C., Willems, K.A., 2008. Detection and Identification of Fish Pathogens: What is the Future? A Review. *Israeli J. Aquaculture-Bamidgeh* 60: 213-229.

Golden, S.M., Stamílio, D.M., Faux, B.M., dela Cruz, W.P., Shoemaker, C.T., Blackmon, C.L., Stassen, S.D., Clark, V.M., Smith, J.W., Johnson, O.L., 2004. Evaluation of a real-time fluorescent PCR assay for rapid detection of Group B Streptococci in neonatal blood. *Diag. Microbiol. Inf. Dis.* 50:7-13.

Hassan, A.A., Khuan, I.U., Lammler, C., 2003. Identification of *Streptococcus dysgalactiae* Strains of Lancefield's group C, G and L by Polymerase Chain Reaction. *J. Vet. Med. B* 50: 161–165.

Hernández, E., Figueroa, J., Iregui, C., 2009. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis sp.*, farm: a case study. *J. Fish Dis.* 39, 247-252.

Ishii, T., Sootome, H., Shan, L., Yamashita, K., 2007. Validation of universal conditions for duplex quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Anal. Bioch.* 362: 201–212.

Ishii, T., Sootome, H., Shan, L., Yamashita, K., 2009. Practical evaluation of universal conditions for four-plex quantitative PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* 388: 271–278.

Jansson, E., Lindberg, L., Saker, E., Aspán, A., 2008. Diagnosis of bacterial kidney disease by real-time PCR. *J. Fish. Dis.* 31: 755-763.

Jiménez, A., Tibatá, V., Junca, H., Ariza, F., Verjan, N., Iregui, C., 2011. Evaluating a nested-PCR for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquaculture* 321: 203-206.

Jung, M.Y., Chang, Y.H., Kim, W. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Lactococcus garviae*. *J. Applied Microbiol.* 108: 1694-1701.

Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C.A.G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M, Figueiredo, H. C. P., 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.* 136:180-183.

Nobrega-Netto, L., Leal, C. A. G., Figueiredo, H. C. P., 2011. *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *J. Fish Dis.* 34: 251-254.

Nomoto, R., Munasinghe, L.I., Jin, D.H., Shimahara, Y., Yasuda, H., Nakamura, A., Misawa, N., Itami, T., Yoshida, T., 2004. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. *J. Fish Dis.* 27: 679–686.

Nomoto, R., Kagawa, H., Yoshida, T., 2008. Partial sequence of *sodA* gene and its application to identification of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolated from farmed fish. *Let. Applied Microbiol.* 46: 95–100.

Panangala, V.S., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., 2007. Taqman polymerase real-time PCR assay for rapid detection of *Flavobacterium columnare*. *Aquaculture Res.* 38:508-517.

Romalde, J.L., Ravelo, C., Valdés, I., Magariños, B., Fuente, E., San Martín, C., Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E., 2008. *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. *Vet. Microbiol.* 130: 198–207.

Sorensen, U.B.S., Poulsen, K., Ghezzi, C., Margarit, I., Kilian, M., 2010. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. mBio. **1**:e00178-10.

Soto, E., Bowles, K., Fernandez, D., Hawke, J.P., 2010. Development of a real-time PCR assay for identification and quantification of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. Dis. Aquat. Organ. **89**: 199-207.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. **22**; 4673–4680.

Table 1 pathogen, target genes, primers/probes name, and sequences of real-time PCR designed

Pathogen	Target gene	Primer/ Probe	Sequence (5' - 3')
<i>S. agalactiae</i>	<i>cfb</i> ¹	FSAGA-F	ATGGGATTTGGGATAACTA
		FSAGA-R	GGTAGCTCTATCAGTTGG
		SAGA-Probe	TTACATCCATTTGCTTCAGT TGATTCAATT
<i>S. dysgalactiae</i>	<i>sodA</i> ²	FSDYS-F	GAGGAATTATTGGCAGATG
		FSDYS-R	GGGCATGGTTTAAATGTC
		SDYS-Probe	ATTCCAGAAGATATTCGTC AAGCCTT

¹*cfb*- CAMP factor; ²*sodA* -superoxide dismutase manganese-dependent

Table 2 Results of bacteriology, PCR and qPCR assays performed from brain, kidney, spleen, liver, muscle and gill of Nile tilapia fingerlings challenged with *S. agalactiae* SA20-06

Fish	Tissue	Bacteriology	PCR	qPCR ¹	
				Singleplex	Duplex
1	Brain	+	+	26.38	27.47
	Kidney	+	+	20.75	22.29
	Spleen	+	+	19.45	20.42
	Liver	+	+	22.57	23.92
	Muscle	-	+	32.37	34.50
	Gill	-	+	22.13	23.39
2	Brain	+	+	23.90	23.61
	Kidney	+	-	36.20	35.50
	Spleen	+	+	31.23	31.08
	Liver	-	-	36.49	36.15
	Muscle	-	-	ND	ND
	Gill	-	-	34.68	36.17
3	Brain	+	+	25.81	27.27
	Kidney	+	+	26.59	27.95
	Spleen	+	+	33.34	37.93
	Liver	+	-	35.44	35.74
	Muscle	-	+	31.79	34.11
	Gill	-	-	ND	ND
4	Brain	+	+	25.30	26.15
	Kidney	+	+	34.78	38.08
	Spleen	-	+	28.82	29.47
	Liver	-	-	35.98	36.90
	Muscle	-	+	32.85	33.37
	Gill	-	-	38.01	ND
5	Brain	+	+	34.43	34.90
	Kidney	-	+	33.03	34.43
	Spleen	-	+	29.29	29.59
	Liver	+	-	34.04	34.12
	Muscle	-	-	34.59	35.49
	Gill	-	-	36.96	37.21
Clinical sensitivity (%)		50	63.3	93.3	90

¹ Mean (n= 3) Cq; ND- not determined

Table 3 Results of bacteriology, PCR and qPCR assays performed from brain, kidney, spleen, liver, muscle and gill of Nile tilapia fingerlings challenged with *S. dysgalactiae* SA64-07

Fish	Tissue	Bacteriology	PCR	qPCR ¹	
				Singleplex	Duplex
1	Brain	+	+	30.83	27.84
	Kidney	+	+	24.08	24.68
	Spleen	+	+	23.26	24.61
	Liver	+	+	24.48	24.72
	Muscle	-	+	27.60	29.45
	Gill	+	+	25.72	26.46
2	Brain	-	-	36.69	37.71
	Kidney	+	-	34.44	34.62
	Spleen	+	-	32.27	33.35
	Liver	-	-	37.63	38.22
	Muscle	-	-	34.44	35.96
	Gill	+	-	32.99	33.25
3	Brain	+	+	34.96	35.26
	Kidney	+	+	32.04	32.80
	Spleen	-	-	30.87	31.96
	Liver	-	-	30.82	30.95
	Muscle	-	-	35.32	36.82
	Gill	-	-	32.29	33.00
4	Brain	+	+	27.98	28.50
	Kidney	+	-	29.01	29.60
	Spleen	+	-	31.55	32.79
	Liver	+	-	33.31	33.15
	Muscle	-	-	ND	ND
	Gill	-	-	32.71	32.65
5	Brain	-	-	38.10	36.79
	Kidney	-	-	36.26	36.41
	Spleen	-	-	35.36	35.87
	Liver	-	-	ND	ND
	Muscle	-	-	ND	ND
	Gill	-	-	37.27	35.53
Clinica sensitivity (%)		46.6	26.6	90.0	90.0

¹ Mean (n= 3) Cq; ND- not determined