

PREZZI, J.A. e DUARTE, K.M.R. Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 831, 2010.



**PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.**

## **Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

---

Joel Alberto Prezzi<sup>1</sup> e Keila Maria Roncato Duarte<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestrando do curso de Produção Animal Sustentável, Instituto de Zootecnia. Rua Heitor Penteado, 56 Nova Odessa, SP 13460-000 e-mail: [joel.prezzi@gmail.com](mailto:joel.prezzi@gmail.com)

<sup>2</sup>Pesquisadora Científica. CPDNAP Instituto de Zootecnia. Rua Heitor Penteado, 56 Nova Odessa, SP 13460-000. e-mail: [keila@iz.sp.gov.br](mailto:keila@iz.sp.gov.br)

---

### **Resumo**

O grande desenvolvimento de métodos moleculares permitiram uma revolução na detecção e quantificação de agentes patogênicos, tanto na saúde humana como na saúde animal. A reação em cadeia da Polimerase (PCR) e seus derivados metodológicos permitem hoje a identificação de doenças precocemente, a identificação de animais portadores de doenças, evitando sua dispersão na prole ou rebanho, bem como o diagnóstico preciso e rápido, permitindo uma rápida intervenção, o que aumenta a sanidade dos rebanhos e conseqüentemente, a qualidade do alimento oferecido ao consumidor.

**Palavras-chave:** PCR, produção animal, sanidade

## **Pathogenic agent detection for livestock using PCR**

### **Abstract**

The great development of molecular methods has revolutionized the detection and characterization of pathogenic agents, important for human health as well as for livestock and animal care. The polymerase chain reaction (PCR) and all the derived methodologies allow early disease identification, detection of animal disease-carriers, avoiding its spreading in the herd, as well as the fast and precise diagnosis, which leads to a fast intervention, increasing herd sanity and consequently, food quality for consumers.

**Keywords:** PCR, animal production, sanity

### **Introdução**

#### **1-Fundamentos da Técnica de PCR**

Em 1993, Kary Mullis, um geneticista ao serviço da Cetus, uma empresa de Biotecnologia da Califórnia, recebeu o prêmio Nobel da Química pelo desenvolvimento de um método que permite sintetizar, em poucas horas e *in vitro*, uma grande quantidade de um determinado fragmento de DNA. Esta técnica faz parte integrante da moderna biotecnologia molecular, tendo trazido um enorme progresso a áreas como o diagnóstico de doenças, medicina forense entre muitas outras para além da Investigação em Biologia.

A técnica de PCR (polymerase chain reaction - reação em cadeia pela polimerase) baseia-se no processo de replicação de DNA que ocorre *in vivo*. Durante o PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA em duas fitas simples, permitindo então a ligação de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), também em fitas simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleotídeos, obtidos por síntese química. Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das seqüências que flanqueiam o fragmento de DNA a

PREZZI, J.A. e DUARTE, K.M.R. Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 831, 2010.

amplificar, nos seus terminais 3', de modo a permitir a atuação da DNA polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar.

Para realizar PCR são necessárias pequenas quantidades do DNA alvo, um tampão salino contendo a polimerase, oligonucleotídeos iniciadores, os quatro desoxinucleotídeos constituintes do DNA e o cofator  $Mg^{2+}$ . Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação que consistem em:

- Desnaturação do DNA alvo pelo calor (tipicamente 1 minuto a 94-96 °C), de modo a separar as duas fitas
- Associação dos iniciadores por ligações de hidrogênio ao DNA alvo em fita simples. Para permitir essa associação, a mistura de reação é arrefecida (tipicamente a temperaturas entre 50 e 65 °C, durante 1 minuto; a temperatura a usar depende da % GC da seqüência a amplificar)
- Extensão dos iniciadores através da síntese da fita complementar de cada fita molde, catalisada pela DNA polimerase (tipicamente 1 minuto a 72 °C)

O processo envolvendo estes três passos pode ser repetido várias vezes (25 a 30 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de DNA pré-existente. Em teoria, se for possível levar a cabo 25 ciclos de amplificação seguidos, a concentração de DNA aumentaria  $2^{25}$  vezes embora, na prática, devido a alguma ineficiência no processo de amplificação, esse aumento fique por um milhão de vezes.

## **2-Técnica de PCR para a Detecção**

A grande dificuldade no diagnóstico da tuberculose reside no tempo necessário para a confirmação diagnóstica. Atualmente, com o aumento no número de co-infecção tuberculose e HIV, além de apresentações atípicas,

PREZZI, J.A. e DUARTE, K.M.R. Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 831, 2010.

depara-se com pacientes muito graves que precisam de instituição de terapêutica rápida e precisa. A associação do HIV e outras micobacterioses tem se tornado freqüente, devendo ser considerada no diagnóstico diferencial da tuberculose.

A baciloscopia além de pouco sensível, é incapaz de diferenciar estas duas situações comuns para o clínico e infectologista. A cultura apesar da alta especificidade,

demandando tempo para o resultado, tempo que geralmente não é disponível frente a casos graves, como os de imunodeficientes. A letalidade da tuberculose em indivíduos infectados pelo HIV pode ser 2,4 a 19 vezes maior que nos indivíduos não infectados.

Por utilizar "primers" que são específicos para micobactérias do complexo *tuberculosis*, a PCR é capaz de, em poucas horas, definir sobre a presença ou não do patógeno na amostra e indicar a melhor terapêutica para o caso. Em condições extremas, esta técnica pode ser refinada para torná-la capaz de determinar não só a presença, mas também a sensibilidade de micobactérias aos tuberculostáticos disponíveis para o tratamento da tuberculose, além de estudos de epidemiologia molecular e tipagem de cepas em cultura. Quando se analisa um novo método, o desempenho do teste-padrão é um parâmetro crítico. Para a detecção do *M. tuberculosis* a cultura pode ser considerada o "gold standard", por ter especificidade de 100% e sensibilidade de aproximadamente 90%<sup>2</sup>. Para que a cultura de um espécime clínico seja positiva são necessárias entre 10 e 100 células de *M. tuberculosis* na amostra<sup>2</sup>. A PCR é capaz de detectar até uma cópia de DNA de *M. tuberculosis*, como já foi demonstrado por Eisenach et al (1990). O presente resultado mostrou um teste capaz de detectar até 3 bacilos em uma solução-padrão (dados não mostrados), o que confirma a extrema sensibilidade da técnica em amplificar seqüências genômicas do *M. tuberculosis*. Em amostras clínicas como o escarro, em que estão presentes várias substâncias inibidoras da PCR, o resultado também foi satisfatório, com sensibilidade de 90%. A padronização da técnica, principalmente da extração do DNA, é fundamental no sucesso do

PREZZI, J.A. e DUARTE, K.M.R. Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 831, 2010.

teste. Observou-se que a lavagem exaustiva do escarro descontaminado é essencial, pois elimina substâncias inibidoras da *Taq* DNA polimerase que poderiam gerar resultados falso-negativos, comprometendo a sensibilidade do teste<sup>5</sup> (Bollela *et al.*, 1999).

Método clássico para a detecção de virúria, o isolamento viral, tem seu uso rotineiro dificultado por necessitar recursos laboratoriais dispendiosos que permitam a manutenção de culturas celulares de fibroblastos humanos e por exigir que as amostras de urina sejam colhidas com assepsia rigorosa e inoculadas logo após a coleta, uma vez que os CMV (citomegalovírus) são muito lábeis. Outro inconveniente desta técnica é a demora na obtenção do resultado do exame, uma vez que os CMV são de replicação lenta, podendo levar semanas para o aparecimento do ECP20. A aplicação da PCR no diagnóstico da infecção por CMV apresenta algumas vantagens sobre o isolamento viral. Para o teste utiliza-se volumes diminutos de material (1 a 2µl) e o seu resultado pode ser obtido em menos de 24 horas. Também, as amostras clínicas a serem testadas por PCR podem ser congeladas e armazenadas (Yamamoto *et al.*, 1998)

A confirmação dos resultados obtidos na PCR para CMV pode ser realizada através de hibridação com seqüência de nucleotídeos específica para a região do genoma amplificada, marcada com isótopo radioativo ou enzima. Entretanto, tal técnica apesar de ser altamente específica, aumenta a complexidade e o custo do teste. A confirmação da seqüência dos nucleotídeos de CMV obtida por PCR, também pode ser feita por técnica denominada *nested* PCR, em que se produz nova amplificação genômica com o emprego de *primers* internos à seqüência inicialmente amplificada. Neste estudo, foi possível a confirmação da PCR para CMV utilizando mais de um par de *primers* separadamente ou através de um PCR *multiplex*, em que os diferentes pares de *primers* são usados conjuntamente. Assim na PCR *multiplex*, utilizando 3 pares distintos de *primers*, amplificadores de regiões diferentes do genoma de CMV, conseguimos obter de forma rápida, o resultado característico com a presença de fragmentos de tamanhos diferentes, relacionados especificamente

PREZZI, J.A. e DUARTE, K.M.R. Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 831, 2010.

a cada um dos *primers*. Nesta situação, cada produto amplificado corresponde a um controle interno da especificidade dos outros fragmentos detectados no mesmo teste, dispensando procedimentos posteriores para a confirmação destes produtos (Yamamoto *et al.*, 1998).

As doenças respiratórias que afetam as aves domésticas criadas comercialmente geram perdas econômicas pelo aumento da mortalidade, custos com medicamentos, queda de postura, redução da qualidade e da eclodibilidade dos ovos, entre outras. Vários vírus e bactérias podem ser responsáveis por estas doenças do trato respiratório, sozinhos ou associados a outros microrganismos, além de sofrerem a influência de fatores não infecciosos, como condições climáticas ou manejo impróprio. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) é uma bactéria recentemente descrita (Vandamme *et al.*, 1994) que foi associada com doenças do trato respiratório em criações de aves comerciais e silvestres. Sua origem é desconhecida, sendo a hipótese mais provável, que tenha se adaptado de aves silvestres para as domésticas (AMONSIN *et al.*, 1997). No Brasil, foram detectados anticorpos por ELISA indireto em 50,8% de 63 amostras de soros de aves dos Estados de SP e MG (ARNS *et al.*, 1998). A detecção de anticorpos específicos pode ser feita através de ensaios imunoenzimáticos (Van Empel *et al.*, 1997) e soroaglutinação rápida em placa (BACK *et al.*, 1998), já a detecção da bactéria pode ser feita pelo isolamento e caracterização bioquímica e sorológica. Como a bactéria cresce lentamente, compete mal com outras espécies presentes na amostra e é de difícil caracterização bioquímica, a PCR torna-se útil para sua detecção e identificação (Van Empel e Hafez, 1999).

Gebara *et al* (2004), observaram que A RT-PCR para a detecção do gene da nucleoproteína do CDV (vírus da cinomose canina), utilizando a urina como amostra biológica, proporcionou o diagnóstico *ante mortem* da cinomose em cães com sinais clínicos sugestivos da infecção. O emprego de um método sensível de diagnóstico *ante mortem* do CDV permite que condutas adequadas de tratamento e profilaxia, tanto da cinomose canina quanto de outras

PREZZI, J.A. e DUARTE, K.M.R. Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 831, 2010.

enfermidades que apresentam sinais clínicos semelhantes, possam ser adotadas com antecipação e eficiência.

A busca da metodologia ideal para o diagnóstico das salmoneloses nos animais, nos alimentos e no homem começou no momento da sua descrição como agente patogênico e permanece até hoje. Várias alternativas têm sido pesquisadas como imunoenaios, imunodifusão, aglutinação em látex, e hibridização do DNA (Blackburn,1993).

A ocorrência de surtos de intoxicação alimentar por salmonelas em diversos países chamou a atenção para fontes comuns de infecção. As investigações epidemiológicas identificaram o consumo de ovos ou alimentos contendo ovos como responsáveis pela maioria dos surtos. Pinto (1999), ao examinar os dados coletados no Rio Grande do Sul, das enfermidades transmitidas por alimentos, pela Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente, relata semelhança com as informações de outros lugares do mundo, como os alimentos mais freqüentemente envolvidos e os agentes causais.

Os métodos analíticos para pesquisa de *Salmonella* em ovos e outros produtos, definem como sendo o diagnóstico bacteriológico com isolamento e identificação do agente a técnica oficial recomendada (Brasil, 1995), porém muitas pesquisas têm sido realizadas visando a introduzir metodologias rápidas e sensíveis para enfrentarem a agilidade que o mercado atual exige.

O desenvolvimento de testes de imunocaptura (IMS) e amplificação do DNA por PCR ou biosensores trouxeram mais rapidez e precisão, com resultados sendo obtidos em torno de 24 horas (Bailey e Cox,1996). Além disso, Oyarzábal (1996) observou que a PCR foi a técnica de maior aceitação entre as demais técnicas moleculares desenvolvidas recentemente, podendo ser empregada como ferramenta de diagnóstico em laboratórios clínicos.

Kongmuang *et al.*(1994) citam que o custo de cada método é também uma preocupação. Tanto partículas como substâncias solúveis são parcialmente removidas por centrifugação de baixa e alta velocidade. Entretanto, algumas bactérias poderiam ser perdidas no processo, bem como a

PREZZI, J.A. e DUARTE, K.M.R. Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 831, 2010.

permanência de substâncias que podem interferir na PCR, levando à diminuição da sensibilidade da técnica.

Rahn *et al.* (1992), usando um par de oligonucleotídeos do gene *InvA*, detectaram com sucesso 626 cepas de *Salmonella* em 630 testadas, a partir de uma colônia isolada e incorporada direto na PCR, obtendo uma sensibilidade de 99,4% e especificidade de 100%, pois não observou reação positiva em nenhum controle negativo pertencentes a outras 33 enterobactérias testadas.

Os métodos moleculares, particularmente a PCR, estão sendo universalmente adotados para o diagnóstico etiológico de diversas viroses em animais (Bélak; Ballagi-Pordány, 1993). As principais vantagens da PCR incluem a rapidez na obtenção dos resultados; a não exigência da infecciosidade da partícula viral e, quando devidamente padronizada, as altas taxas de sensibilidade e especificidade (Mcpherson; Taylor; Quirke, 1994).

A aplicação da PCR também tem sido efetuada com sucesso em amostras de sêmen bovino, minimizando os riscos de transmissão do BHV-1 para vacas inseminadas artificialmente (Van Engelenburg *et al.*, 1993; Wiedmann *et al.*, 1993; Xia *et al.*, 1995; Masri *et al.*, 1996; Kataria *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 1998).

### **Conclusões e perspectivas**

Diante das situações descritas nesta revisão, pode-se afirmar que o PCR pode e deve ser amplamente utilizado para diagnosticar grande parte de agentes patogênicos e assim facilitar a obtenção de tratamentos, bem como a sua utilização em pesquisas microbiológicas que envolvam animais, alimentos, seres humanos, entre outros.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AMONSIN, A. *et al.* Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.11, p.2894-2898, 1997.

PREZZI, J.A. e DUARTE, K.M.R. Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 831, 2010.

ARNS, C.W. *et al.* **Ornithobacterium rhinotracheale: Detecção sorológica em aves matrizes e frangos de corte.** In: CONFERÊNCIA APINCO, 1998, Campinas SP. Trabalhos concorrentes ao .Prêmio Pesquisa Avícola José Maria Lamas da Silva.... Campinas : Facta,1998. p.55.

BACK, A. *et al.* Development of a serum plate agglutination test to detect antibodies to *Ornithobacterium rhinotracheale*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.10, p.84-86, 1998.

BAILEY, J.S., COX, N.A. Detecting specific **Salmonella** strains. **World Poultry, Special for Salmonella**, Netherlands, May, p.18-19, 1996.

BLACKBURN, C.W. A review, rapid and alternative methods for the detection of **Salmonellas** in foods. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.3, n.75, p.199-214, 1993.

BÉLAK, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v.17, p.55-72, 1993.

BOLLELA, V.R. *et al.* Problemas na Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase para Diagnóstico da Tuberculose Pulmonar. **Rev. Saúde Pública**, 33 (3): 281-6, 1999 [www.fsp.usp.br/~rsp](http://www.fsp.usp.br/~rsp)

BRASIL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria da Defesa Agropecuária. Método Analítico de Carcaças de Aves e Pesquisa de **Salmonella**. **Diário Oficial da União**, Brasília, Portaria nº.08 de 23/01/1995, p.1182-1184, em 27/01/95.

EISENACH, K.D. *et al.* Polimerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **J Infect Dis** 1990; 161:977-81.

GEBARA, C.M.S. *et al.* Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.4, p.480-487, 2004.

KATARIA, R. S. *et al.* Detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genomic sequences in bovine semen inoculated with BHV-1 by polymerase chain reaction. **Acta Virologica**, Bratislava, v.41, p.311-315, 1997.

KONGMUANG, U. *et al.* Comparison of three stool processing methods for detection of **Salmonella** serogroups B, C2 and D by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.12 p.3072-3074, 1994.

MASRI, S. A. *et al.* Rapid detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. **Canadian Journal Veterinary Research**, Ottawa, v.60, p.100-107, 1996.

Mc PHERSON, Q. P. *et al.* **PCR a practical approach**. Oxford: Information Press, Ltd., 1994. 247 p.

OYARZÁBAL, O.A. Técnicas moleculares para o diagnóstico de patógenos aviários. **Avicultura Profissional**, v.14, n.16, p.19-21, 1996.

PINTO, A.T. **Ocorrência de enfermidades bacterianas transmitidas por alimentos no estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, RS,1999. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

RAHN, K. *et al.* Amplification of *InvA* gene sequence of **Salmonella typhimurium** by polymerase chain reaction as a specific method of detection of **Salmonella**. **Molecular and Cellular Probes**. London, v.6, p.271-279, 1992.

ROCHA, M. A. *et al.* A high sensitivity nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.63, p.1-11, 1998.

PREZZI, J.A. e DUARTE, K.M.R. Detecção de agentes patogênicos em animais de produção através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 18, Ed. 123, Art. 831, 2010.

VANDAMME P. *et al.* *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.44, n.1, p.24-37, 1994.

VAN EMPEL, P.C.M. *et al.* Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.418-421, 1997.

VAN EMPEL, P.C.M.; HAFEZ, H.M. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. **Avian Patology**, v. 28, n.3, p.217- 227, 1999.

VAN ENGELBURG, F. A. C. *et al.* Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.31, n.12, p.3129-3135, 1993.

YAMAMOTO, A.Y. *et al.* Diagnóstico de infecção congênita e perinatal por citomegalovírus utilizando a reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 31(1):19-26, jan-fev, 1998.

WIEDMANN, M. *et al.* Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.44, p.129- 140, 1993.

XIA, J. Q. *et al.* Detection of bovine herpesvirus 1 in the semen of experimentally infected bulls by dot-blot hybridisation, polymerase chain reaction and virus isolation. **Research in Veterinary Science**, London, v.59, p.183-185, 1995.