

APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS DE PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS DOS ANIMAIS

Dionei Joaquim HAAS¹, Ana Caroline Doyle TORRES¹

RESUMO

A reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica de biologia molecular revolucionária, pois permitiu o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucleicos, proporcionando grandes avanços em diversas áreas do conhecimento. O diagnóstico de doenças infecciosas dos animais é realizado, historicamente, com técnicas que avaliam características fenotípicas do patógeno. No entanto, o estado da arte do diagnóstico de doenças infecciosas sofreu mudanças significativas nessas últimas décadas após o advento da PCR. Possui capacidade de detectar agentes infecciosos com alta sensibilidade e especificidade, sem necessidade de encontrar microrganismos viáveis na amostra biológica.

Palavras-chave: biologia molecular, ácido nucleico, execução, avanço, confiabilidade

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR - Polymerase Chain Reaction) is a revolutionary molecular biology technique, because it allowed the rapid development of the study of nucleic acid sequences, providing great advances in many areas of knowledge. The diagnosis of infectious animal diseases is done historically with techniques that assess phenotypic characteristics of the pathogen. However, the state of the art diagnosis of infectious diseases has undergone significant changes in recent decades after the advent of PCR. It is capable of detecting infectious agents with high sensitivity and specificity without need for viable microorganisms in the biological sample.

Keywords: molecular biology, nucleic acid, execution, progress, reliability

INTRODUÇÃO

O objetivo deste trabalho é trazer uma atualização sobre a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), visto que, esta técnica revolucionária de biologia molecular tem sofrido diversas adaptações visando com isso, maior confiabilidade dos resultados obtidos. No campo da Medicina Veterinária, a utilização desta técnica está abrindo caminhos para vastos campos de pesquisa, já que é uma técnica altamente sensível e específica, tornando-se desta forma uma aliada no controle das principais doenças que acometem os animais de interesse veterinário.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica de biologia molecular revolucionária, pois permitiu o rápido desenvolvimento do estudo de sequências de ácidos nucleicos, proporcionando com isso grandes avanços em

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG - Belo Horizonte/MG – Brasil. Email: dioneihaas@hotmail.com, anadoyle@gmail.com

diversas áreas como, por exemplo, medicina forense, genética, sequenciamento do genoma humano e microbiano e diagnóstico de doenças de infecciosas (MOLINA; TOBO, 2004).

A técnica foi idealizada e desenvolvida pelo bioquímico estadunidense Kary Banks Mullis, que posteriormente obteve o reconhecimento ao ganhar o prêmio Nobel de química em 1993.

A PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias de fragmentos específicos de ácidos nucleicos, onde a partir de uma única molécula de DNA molde, é possível gerar até cem bilhões de moléculas similares em uma reação (SAIKI et al., 1988; MULLIS; FALOONA, 1987; MULLIS, 1990).

A técnica de PCR promove, por meio de etapas de variação de temperatura, a duplicação de cadeias de DNA *in vitro*. A reação envolve o emprego dos quatro deoxinucleotídeos (dNTPs) do DNA (A-T-C-G), sequências de iniciadores específicos ou *primers*, uma DNA polimerase termoestável, o DNA molde - previamente extraído da amostra clínica suspeita, cloreto de magnésio (MgCl₂) - um cofator para atividade da *Taq* DNA polimerase, um tampão, geralmente cloreto de potássio (KCl), para manter pH e condição adequada para atividade enzimática e água ultrapura, como diluente.

Segundo Erlich (1995), a técnica consiste basicamente em três etapas: a dupla fita de DNA é desnaturada pelo calor; em seguida, cada *primer* (senso e anti-senso) anela a uma das fitas simples do DNA e após, ocorre o processo de extensão e polimerização da fita, a partir da adição de nucleotídeos e ação da *Taq* DNA polimerase.

A reação de amplificação é catalizada pela *Taq* DNA polimerase (enzima termoestável extraída da bactéria extremófila *Thermus aquaticus* que é encontrada em fontes hidrotermais), a qual alonga um pequeno fragmento de DNA de fita simples, chamado de oligonucleotídeo iniciador ou *primer*, quando este, por sua vez, encontra-se ligado a uma fita molde de DNA (SAIKI et al., 1988). O alongamento é feito pela adição na extremidade 3' do iniciador, do nucleotídeo complementar ao nucleotídeo correspondente na fita molde. O fragmento amplificado pela PCR é aquele compreendido entre as duas extremidades 3' de um segmento duplex, complementares aos dois iniciadores utilizados na reação (GONÇALVES, 2006).

Por ser uma enzima termoestável, a *Taq* DNA polimerase permite a realização de múltiplos ciclos de reação, com uma única adição de enzima, o que possibilitou a automatização da reação e conseqüentemente a generalização de seu uso. A *Taq* DNA polimerase suporta temperaturas de 95°C e é mais ativa entre 70°C e 75°C, temperatura em que o pareamento entre os iniciadores e o DNA é mais específico (SINGER et al., 1993).

Os iniciadores ou *primers* são fitas de DNA geralmente com 18-22 nucleotídeos (A, T, C, G) sintetizados *in vitro*, tendo como base uma seqüência de nucleotídeos complementares às seqüências que delimitam o fragmento de ácido nucléico a ser amplificado. Na PCR são utilizados dois iniciadores, um senso e um anti-senso, que irão se anelar por complementariedade, a cada uma das fitas simples do DNA molde após a desnaturação (GONÇALVES, 2006). Para identificação de microrganismos, por exemplo, os iniciadores geralmente são desenhados para amplificar parte de um gene conservado na espécie microbiana, como genes essenciais ao ciclo de vida e o 16S ribossomal (PETTI; POLAGE; SCHRECKENBERGER et al., 2005).

A PCR inicia pela separação das fitas moldes de DNA, através da elevação de temperatura da reação, fase essa denominada desnaturação. Após a temperatura é então diminuída, para que haja o anelamento dos iniciadores com o molde de DNA, e a polimerase possa atuar estendendo um novo fragmento. O fragmento produzido na reação anterior serve também como molde para a reação seguinte (GONÇALVES, 2006).

A temperatura de anelamento usada na PCR depende do comprimento e composição (citosina/guanina) dos *primers* (WARFORD et al., 1988). Idealmente, a temperatura de anelamento deve ser 1 a 5 °C abaixo da temperatura de *melting* (T_m - *Temperature melting*) (BAUMFORTH et al., 1999), que é a temperatura na qual 50% das moléculas do conjunto *primer*/DNA estão separadas e as outras 50% estão ainda hibridizadas (OLIVEIRA, 2010). Uma temperatura de anelamento baixa demais produz pouca adstringência, resultando em amplificação de fragmentos inespecíficos, enquanto que, uma temperatura de anelamento muito acima da T_m , pode impedir o anelamento dos *primers*, resultando em pouco ou nenhum produto amplificado (BAUMFORTH et al., 1999).

Com isso, no processo da PCR, o DNA é desnaturado a 94-97°C, os *primers* são hibridizados a 50-65°C e, posteriormente, a síntese de DNA é feita com DNA-polimerase e desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) a 72°C. A repetição dessas etapas, por cerca de 25 a 45 ciclos, permite à amplificação de milhares de segmentos específicos de DNA (PASSAGLIA; ZAHA, 2001). A cada ciclo, a quantidade de fragmentos de DNA na reação dobra.

Apesar de sua vasta aplicabilidade, não existe um protocolo único que seja apropriado para todas as situações, sendo assim, é necessário que seja realizada uma otimização para cada nova aplicação do PCR (INNIS; GELFAND, 1990).

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase é extremamente flexível, permitindo, com isso, uma série de modificações que possibilitam o seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras. Entre as principais técnicas resultantes de modificações da reação em cadeia da polimerase, podemos citar o PCR *multiplex* e PCR em tempo real (MOLINA; TOBO, 2004).

PCR MULTIPLEX

PCR *multiplex* é uma reação em que várias regiões diferentes do DNA são amplificadas ao mesmo tempo, e no mesmo recipiente, devido à utilização simultânea de vários pares de *primers* específicos para cada *locus* a ser identificado. Se a temperatura de anelamento dos diferentes *primers* for semelhante e os diferentes fragmentos de DNA produzidos apresentarem tamanhos distintos, é possível que o diagnóstico seja realizado através de um PCR *multiplex* (ROSSETI; SILVA; RODRIGUES, 2006).

A técnica de *multiplex* foi desenvolvida com a finalidade de promover a diferenciação entre várias espécies ou gêneros microbianos simultaneamente, considerando ser este um teste único e altamente específico (OLIVEIRA et al., 2007).

Uma das vantagens da técnica é a maior rapidez na obtenção do resultado, assim como maior economia de reagentes, quando comparada a realização de uma PCR para cada agente infeccioso individualmente. Outra vantagem, é que como vários *locus* são amplificados simultaneamente na mesma reação, há necessidade de uma quantidade menor de ácido nucleico para o diagnóstico, que por vezes pode ser um fator limitante (ROSSETI; SILVA; RODRIGUES, 2006).

PCR EM TEMPO REAL

A PCR em tempo real (Real-Time PCR), é um método semi-quantitativo (qPCR), muito sensível e permite obter resultado em um curto período de tempo. A tecnologia está distribuída mundialmente, suprimindo a necessidade na área médica de se ter um teste diagnóstico eficiente e rápido. Atualmente existem protocolos e *kits* comerciais para identificar uma grande quantidade de patógenos com importância médica. A técnica permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em um só passo (REGITANO et al., 2007)

A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação e captura da emissão da fluorescência, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação (NOVAIS; PIRES, 2004). Várias tecnologias de PCR em tempo real estão disponíveis no mercado. Os dois sistemas mais usados são o SYBR Green® e o TaqMan® (KAEDA; CHASE; GOLDAN, 2002).

A técnica de PCR em tempo real é baseada em duas descobertas importantes: a primeira é a atividade exonuclease 5'-3' da enzima *Taq* DNA polimerase e a segunda é a construção de sondas de oligonucleotídeos duplamente marcadas. As sondas emitem sinal de fluorescência somente quando clivadas (REGITANO et al., 2007).

A PCR em tempo real gera um ciclo limiar (*Cycle Threshold* - CT) ou ponto passagem (*crossing point*-CP) para cada amostra. Este é o ponto em que o produto (fluorescência) cruza um limite (limiar) pré-determinado (*threshold*). Quanto maior a quantidade de DNA alvo (sequência a ser amplificada) de partida na reação, mais baixo será o CT, pois serão necessários menor número de ciclos à reação para ultrapassar o limiar (TANG; STRATTON, 2006).

SISTEMA TAQMAN®

O sistema TaqMan® utiliza a atividade exonucleásica 5'-3' da *Taq* DNA Polimerase e tem sido amplamente utilizada. Essa enzima degrada uma sonda marcada que anela especificamente na parte interna do segmento a ser amplificado entre dois *primers* (VAN DER, 2003).

A tecnologia TaqMan[®] utiliza uma sonda, específica para o gene de interesse, que é duplamente marcada com um fluoróforo *reporter* em uma extremidade e um fluoróforo “silenciador” (*quencher*) na outra. Na forma íntegra, a transferência de energia fluorescente ocorre de forma que a emissão pelo repórter é absorvida pelo *quencher* (REGITANO et al., 2007).

No entanto, quando ocorre a degradação da sonda pela atividade exonuclease da enzima TaqDNA polimerase, os fluoróforos *reporter* e *quencher* são separados e a emissão de fluorescência do *reporter* não será mais absorvida pelo *quencher* resultando em aumento de emissão de fluorescência pelo *reporter* que será detectada e quantificada. O sinal fluorescente é captado a cada ciclo até atingir um limiar (*threshold*), no qual todas as amostras podem ser comparadas (REGITANO et al., 2007; NONAKA, 2012).

Este limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência. É um ponto definido pelo pesquisador e obrigatoriamente deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência de base (*background*) (NONAKA, 2012). O limiar é definido na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde amplificada pela reação (ALMEIDA et al., 2007).

Na PCR em tempo real, a amplificação pode ser dividida em quatro fases: *baseline*, a amplificação está abaixo do nível de detecção do instrumento; exponencial à amplificação está ocorrendo com taxa máxima de eficiência, sendo o aumento da fluorescência diretamente proporcional ao aumento de produto amplificado durante os ciclos. A duração dessa etapa depende da qualidade e concentração dos reagentes, sendo que nesta são consumidos a maior parte dos reagentes. A fase linear, a um decréscimo na eficiência de amplificação, pois os reagentes da reação foram consumidos na fase anterior (NONAKA, 2012). A fase platô é alcançada rapidamente ao final da reação, onde ocorrem os últimos ciclos da PCR (DORAK, 2006).

Quando comparada com químicas não específicas como, o SYBER Green[®], a sonda usada junto com *primers* aumenta especificidade do ensaio de PCR, uma vez que inclui um terceiro oligonucleotídeo na reação (DORAK, 2006). As desvantagens do sistema

são a necessidade de síntese de diferentes sondas para sequências distintas e custo elevado da mesma (NONAKA, 2012).

SISTEMA SYBRGREEN®

O SYBR Green® é um agente intercalante do DNA, um sistema simples usado para detecção de RNA ou DNA na metodologia de PCR em tempo real. Esse método envolve a incorporação do corante livre, SYBR Green®, a uma molécula de DNA, recém-sintetizada. A detecção é monitorada através da intensidade de fluorescência ao longo dos ciclos. Durante os primeiros ciclos da PCR, o sinal de fluorescência emitido pelo SYBERGreen®, é fraco para ser detectado, no entanto, durante a fase exponencial o sinal aumenta proporcionalmente à quantidade de DNA sintetizado pela PCR (NONAKA, 2012). Ao final da reação, na fase de platô, o sinal para de aumentar, indicando que a PCR está atingindo a saturação (DORAK, 2006). A diferenciação dos produtos da PCR é possível através da análise da curva de dissociação da fita dupla, que ocorre com o aumento da temperatura (GUDNASON, 2007). Dentre as vantagens de aplicação desta técnica podemos citar: baixo custo, facilidade para desenvolver o ensaio e apenas um par de *primer* é necessário. A principal desvantagem, no entanto, é a inespecificidade da reação (NONAKA, 2012), uma vez que o corante se liga a qualquer molécula fita dupla (DNA alvo ou não e dímeros de *primers*) e gera um sinal de fluorescência (DORAK, 2006).

APLICAÇÕES DA PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS DOS ANIMAIS

A partir da década de 1980, as técnicas moleculares, como a PCR, começaram a ser utilizadas como métodos alternativos aos métodos fenotípicos tradicionais, utilizados no diagnóstico de doenças infecciosas. Devido à sua capacidade em detectar agentes infecciosos com alta sensibilidade e especificidade (HOFMANN, GRIOT, CHAIGNAT et al., 2008), sem necessidade de se encontrar microrganismos viáveis na amostra biológica, a PCR tornou-se uma ferramenta de diagnóstico valiosa e muito confiável para o diagnóstico e monitoramento de doenças dos animais. A partir da PCR, é possível avaliar a presença de pequenas quantidades de DNA do patógeno em diferentes amostras clínicas como, leite, sangue, fezes, secreções e tecidos em poucas horas e cada

vez com um custo financeiro menor. Em função disso, atualmente a PCR é amplamente utilizada no diagnóstico de infecciosas em várias espécies animais de interesse veterinário (Tabela 1).

A PCR aumentou significativamente a sensibilidade e especificidade diagnóstica de doenças infecciosas dos animais, facilitando o diagnóstico de doenças complexas e a identificação de patógenos que possuem alto potencial zoonótico e aqueles com crescimento *in vitro* extremamente lentos ou fastidiosos. Em função disso, a PCR é recomendada e prescrita pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como método diagnóstico para várias doenças infecciosas, inclusive para trânsito internacional (OIE, 2015).

A técnica de PCR permite identificar patógenos altamente zoonóticos como, por exemplo, *Brucella abortus* e *Mycobacterium bovis* direto de tecidos tornando o diagnóstico mais rápido e seguro ao laboratorista (ARAÚJO et al., 2014; GWIDA et al., 2016). Assim como tornou mais fácil e confiável o diagnóstico de doenças causadas por microrganismos fastidiosos, ou seja, aqueles com alta exigência nutricional e de difícil crescimento *in vitro*, como determinadas espécies de *Mycoplasma* e *Campylobacter* (HUM et al., 1997; BUIM et al., 2009).

Essa indispensável técnica molecular tem sido reconhecida como uma importante ferramenta diagnóstica para a identificação de ruminantes infectados com *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, o agente etiológico da paratuberculose bovina. As técnicas de diagnóstico comumente utilizadas para o diagnóstico de paratuberculose são o cultivo bacteriano, detecção de anticorpos e resposta celular, no entanto, elas apresentam muitas limitações como, por exemplo, a necessidade de longo período para obtenção do resultado, baixa sensibilidade e falhas em detectar infecções recentes. Nesse sentido, a PCR tem-se mostrado uma excelente alternativa para diagnóstico da doença.

A detecção de DNA de *Leptospira* spp. diretamente da urina aumenta significativamente as chances de identificar animais doentes ou portadores, e além disso, contorna dificuldades laboratoriais, pois o isolamento de *Leptospira* spp. é bastante difícil (SOUSA et al., 2014).

Em aves, a PCR auxilia no diagnóstico de doenças zoonóticas como, por exemplo, *Chlamydophila psittaci*. A doença em humanos é adquirida pela inalação do microrganismo presente nas secreções ou fezes secas dos pássaros infectados (VANBUUREN et al., 1994). A Cultura do microrganismo é possível, porém pouco viável (CROOK; BANNISTER, 1996). Com isso, técnicas mais confiáveis como, reação em cadeia da polimerase e detecção de antígeno através de imunofluorescência com anticorpo monoclonal, são as preferidas por serem métodos rápidos, confiáveis e de grande especificidade (SILLIS; WHITE, 1990).

Outro agente de grande importância na avicultura é o *Avibacterium paragallinarum* responsável pela Coriza Infecciosa das Galinhas (CI). O método tradicional para o diagnóstico de CI requer o isolamento da bactéria suspeita e em seguida uma caracterização bioquímica para confirmar a identidade do isolado (BLACKALL; MATSUMOTO; YAMAMOTO, 1997). No entanto, em laboratórios de países em desenvolvimento onde geralmente os recursos são escassos e problemas de contaminação são recorrentes, o diagnóstico de CI pela cultura e a caracterização com testes bioquímicos é complicado (CHEN; MIFLIN; ZANG et al., 1998). Portanto, a superioridade do teste de PCR em relação à cultura tradicional é evidente pelo simples fato de que para o sucesso na cultura, o microrganismo deve encontrar-se viável. Além de que testes de diagnóstico baseados na PCR oferecem vantagens consideráveis para bactérias como *A. paragallinarum* que são fastidiosas e de difícil crescimento (BYARUGABA; MINGA; GWAKISA et al., 2006).

Tabela 1: Aplicação da PCR para diagnóstico de doenças infecciosas em espécies animais de interesse veterinário

| Espécie animal | Doença | Agente etiológico | Amostra clínica | Referência |
|----------------|--------------------------------|---|---|-------------------------|
| Aves | Micoplasmose | <i>Mycoplasma gallisepticum</i> | Suabe traqueal, pulmão, traquéia | Wang et al, 1997 |
| | Clamidiose | <i>Chlamydophila psittaci</i> | Suabe traqueal, fezes pulmão, traqueia, fígado | Sachse et al., 2009b |
| | Coriza Infecciosa das galinhas | <i>Avibacterium paragallinarum</i> | Suabe traqueal, traquéia, pulmão | Chen et al, 1996 |
| | Anemia Infecciosa das galinhas | Vírus da anemia infecciosa das galinhas | Sangue total, baço, fígado, timo | Rozen e Skaletsky, 2000 |
| | Campilobacteriose genital | <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> | Lavado prepucial, sêmen, muco cervical, feto e placenta | Hum et al., 1997 |
| | Rinotraqueite | Herpesvírus bovino | Sêmen | Van |

| | | | | |
|--------------------------|--|---|---|-----------------------------|
| Bovinos | infecciosa | 1 | | Engelenburg et al., 1993 |
| | Leucose enzoótica | Vírus da leucemia | Tumores, células mononucleares | Spadetto e Dias, 2013 |
| | Babesiose | <i>Babesia bovis</i> e <i>B. bigemina</i> | Sangue total | Buling et al., 2007 |
| Cães | Leptospirose | <i>Leptospira</i> spp. | Urina | Akuzawa et al., 2001 |
| | Leishmaniose | <i>Leishmania</i> spp. | Sangue total, pele, baço, fígado e linfonodos | Assis et al., 2010 |
| | Cinomose | Vírus da cinomose | Sangue total, urina, descarga nasal e saliva | Shin et al., 2004 |
| | Parvovirose | Vírus da parvovirose | Fezes | Strottmann et al., 2008 |
| Gatos | Batolenose | <i>Bartonella henselae</i> e <i>B. quintana</i> | Sangue total | Souza et al., 2010 |
| | Imunodeficiência | Vírus da imunodeficiência | Sangue total | Arjona et al., 2007 |
| | Leucemia | Vírus da leucemia felina | Sangue total | Arjona et al., 2007 |
| | Peritonite infecciosa felina | Coronavírus felino | Fezes, soro, fluido ascítico, omento, rins, fígado, baço | Herrewegh et al., 1995 |
| Ovinos e caprinos | Aborto enzoótico | <i>Chlamydophila abortus</i> | Feto abortado e placenta | Thiele et al., 1992 |
| | Linfadenite caseosa | <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> | Pús de abscessos | Pacheco |
| | Língua azul | Vírus da Língua azul | Sangue, baço e linfonodos | Hofmann et al., 2008 |
| | Artrite e encefalite caprina e Medi-Visna | Vírus da Artrite/encefalite caprina e vírus da MV | Leite, úbere e membrana sinovial | Deandres et al., 2005 |
| Equinos | Anemia Infecciosa | Vírus da anemia infecciosa | Sangue periférico | Nagarajan & Simard, 2001 |
| | Arterite Viral | Vírus da arterite | Fluido nasofaríngeo e conjuntival, sangue e sêmen | Miszczak et al., 2011 |
| | Influenza | Vírus influenza A | Secreção respiratória | Quinlivan et al., 2005 |
| | Piroplasmose | <i>Theileria equi</i> e <i>Babesia caballi</i> | Sangue total | Alhassan et al., 2005 |
| Suínos | Doença de Aujeszky | Herpesvírus suídeo 1 | Cérebro, tonsilas, fluido nasal e faríngeo | Fonseca Júnior et al., 2013 |
| | Influenza | Vírus da influenza A | Pulmão e suabe nasal | Slomka et al., 2010 |
| | Síndrome Respiratória e Reprodutiva dos Suínos | Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva | Tonsilas, pulmão, linfonodos, baço, soro sanguíneo e fluidos orais | Wernike et al., 2012 |
| | Peste Suína Clássica | Vírus da peste suína clássica | Tonsilas, baço, rins, linfonodos, porção distal do íleo, sangue e soro, | McGoldrick et al., 1998 |

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A PCR é um método *in vitro* capaz de produzir grandes quantidades de um fragmento específico de DNA, de tamanho e sequência definidos, a partir de uma pequena quantidade de um molde de ácido nucleico. Atualmente a técnica possui variações, como a *multiplex*, *nested* e tempo real, que aumentaram as possibilidades de pesquisas e diagnóstico. Em função de suas qualidades e constante evolução, a PCR tem proporcionado grandes avanços em várias áreas do conhecimento. Na Medicina Veterinária, o método tem contribuído significativamente no diagnóstico e pesquisa de doenças infecciosas dos animais, pois é capaz de detectar agentes infecciosos em poucas horas com alta sensibilidade e especificidade, sem necessidade de haver microrganismos viáveis na amostra biológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKUZAWA, M.; TANAKA, M.; MURAKAMI, T.; OISHI, A.; DEGUCHI, E.; MISUMI, K.; FUJIKI, M.; YASUDA, N.; SUGIMURA, T.; FUSHUKU, S. PCR for detecting *Leptospira* in canine urine and its clinical applications, *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, v.54, n. 4, p. 288-292, 2001.

ALHASSAN A., PUMIDONMING W., OKAMURA M., HIRATA H., BATTSETSEG B., FUJISAKI K., YOKOYAMA N. & IGARASHI I. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Veterinary Parasitology*, n.129, p.43-49, 2005

ALMEIDA, P.S.R.; SADDI, V.A. Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real. *Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia*, v.29, n.4, 2007.

ARAÚJO, C.P.; OSÓRIO, A.L.; JORGE, K.S.; RAMOS, C.A.; SOUZA FILHO, A.F.; VIDAL, C.E.; VARGAS, A.P.; ROXO, E.; ROCHA, A.S.; SUFFYS, P.N.; FONSECA JR, A.A.; SILVA, M.R.; BARBOSA NETO, J.D.; CERQUEIRA, V.D.; ARAÚJO, F.R. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues through nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 633-640, 2014.

ARJONA, A.; BARQUERO, N.; DOMÉNECH, A.; TEJERIZO, G.; COLLADO, V.M.; TOURAL, C.; MARTÍN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 9, n. 1, p. 14-22, 2007.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N.M.G.P.; DA SILVEIRA, R.C.V.; NUNES, C.M.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; NORONHA JUNIOR, A.C.F.; NEVES, M.F.; MACHADO, R.Z.; BUZETTI, W.A.S. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010.

BAUMFORTH, K.R.; NELSON, P.N.; DIGBY, J.E.; O'NEIL, J.D.; MURRAY, P.G. Demystified ... the polymerase chain reaction. *Molecular Pathology*, v.52, n. 1, p. 1-10, 1999.

BLACKALL, P.J., MATSUMOTO, K.; YAMAMOTO, R. Infectious coryza. p.179-190. In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M. (Eds), *Diseases of Poultry* 10th ed. Iowa State University Press, Ames, IA. , 1997.

BUIM, M.R.; METTIFOGO, E.M.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; FERREIRA, A.J.P. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 7, p. 552-556, 2009.

- BULING A., CRIADO, F. A., ASENZO G., BENITEZ D., BARBA, C. J.C. & FLORIN-CHRISTENSEN M.A. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary Parasitology**, n.147, p.16–25, 2007
- BYARUGABA D.K., MINGA U.M., GWAKISA P.S., KATUNGUKA E.R., BISGAARD M.S. & OLSE J.E. Occurrence, isolation and characterisation of *Avibacterium paragallinarum* from poultry in Uganda. Proc. 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics. **Avian Disease**, n.51, n. 2, p.534-539, 2006.
- CHEN X., MIFLIN J.K., ZANG P. & BLACKALL P.J. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. **Avian Disease**, v. 40, n. 2, p.398-407, 1996.
- CHEN X., CHEN Q., ZANG P., FENG W. & BLACKALL P.J. Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. **Avian Pathology**, n.27,p.296-300, 1998
- CROOK,T., BANNISTER, B. Acute transverse myelitis associated with *Chlamydia psittaci* infection. **Journal of Infection**, n.32, p. 151-152, 1996.
- DEANDRES, D., KLEIN, D., WATT N.J., BERRIATUA,E., TORSTEINSDOTTIR, S., BLACKLAWS, B.A. & HARKISS G.D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, n. 107,p. 49–62, 2005.
- DORAK, M. T. (Ed). **Real-time PCR**. International University Line, La Jolla, CA, USA, 333p., 2006
- ERLICH. A.E. PCR. Tecnologic. In MEYERS, R.A. **Molecular biology and biotechnology**. A comprehensive desk reference. New York: Vch. p.641-648, 1995.
- FONSECA, J.; COTORELLO, A.C.; DIAS, N.L.; D'AMBROS, R.; LEITE, R.C.; HENEIMANN, M.B.; REIS, J.K.P. PCR em tempo real para detecção do vírus da doença de Aujeszky. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n.3, p. 801-808, 2013.
- GONÇALVES, D. **Caracterização molecular de isolados de *Staphylococcus aureus* e produção de marcadores genéticos para diagnóstico de mastite em bovinos leiteiros**. Tese (Saúde Animal). 2006. 137f. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2006.
- GUDNASON, H. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. **Nucleic Acids Research**, v.35, p. 127, 2007.
- GWIDA, M.; EL-ASHKER, M.; MELZER, F.; EL-DIASTY, M.; EL-BESKAWY, M.; NEUBAUER, H. Use of serology and real time PCR to control an outbreak of bovine brucellosis at a dairy cattle farm in the Nile Delta region, Egypt. **Irish Veterinary Association**, v. 69, n. 3, p. 1-7, 2016.
- HERREWEGH, A.A.P.M.; DE GROOT, R.J.; CEPICA, A.; EGBERINK, H.F.; MARIAN C. HORZINEK, M.C.; ROTTIER, P.J.M. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 684-689, 1995.
- HOFMANN, M., GRIOT, C., CHAIGNAT, V., PERLER, L. & THÜR, B. Bluetongue disease reaches Switzerland. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, n.150, p.49–56, 2008.
- HUM, S.; QUINN, K.; BRUNNER, J.; ON, S.L. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. **Australian veterinary journal**, v. 75, n. 11, 1997.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. **PCR protocols: A guide to Methods and applications**. Academic press, c. 1, p. 3-12, 1990.
- KAEDA, J.; CHASE, A.; GOLDMAN, J.M. Cytogenetic and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukaemia. **Acta Haematologica**, v. 107, p. 64-75, 2002.

MCGOLDRICK A., LOWINGS J.P., IBATA G., SANDS J.J., BELAK S. & PATON D.J. A novel approach to the detection of classical swine fever virus by RT-PCR with a fluorogenic probe (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, n.72, p.125–135, 1998.

MISZCZAK, F., SHUCK, K.M., LU, Z., GO Y.Y., ZHANG J., SELLS S., VABRET A., PRONOST S., FORTIER G., TIMONEY P.J. & BALASURIYA U.B.R. Evaluation of two magnetic-bead-based viral nucleic acid purification kits and three real-time reverse transcription-PCR reagent systems in two TaqMan assays for equine arteritis virus detection in semen. **Journal of Clinical Microbiology**, n.49, p.3694–3696, 2011.

MOLINA, A.L.; TOBO, P. R. Série Biologia Molecular Parte 2- **Uso das Técnicas de biologia molecular para diagnóstico**. Hospital Israelita Albert Einstein. São Paulo-SP.2004.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. **Methods in Enzymology**. San Diego. v. 55, p.335-350, 1987.

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique**, v. 48, n. 8, p. 579-582, 1990.

NAGARAJAN, M.M., SIMARD C. Detection of horses infected naturally with the equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, n.94, p. 97–109, 2001.

NONAKA, C.K.V. **Padronização e verificação de desempenho de uma PCR em tempo real para diagnóstico da doença de Aujeszky utilizando os sistemas Syber Green I, Sonda de Hibridização e Plexor**. Dissertação (Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.

NOVAIS, C. M.; PIRES, A. M. PCR em Tempo Real. **Revista Biotecnologia Ciência Desenvolvimento**, n. 33, p. 10-13, 2004.

OIE, 2015. List of tests for international trade. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/0.02_PRESCRIBED_TESTS_2015.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2016.

OLIVEIRA, M.C.S.; REGITANO, L.C.A.; ROESE, A.D.; ANTHONISEN, D.G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M.M.; SCAGLIUSI, S.M.M.; TIMÓTEO, W.H.B.; JARDIM, S.N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase** – São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. 43 p., 2007

OLIVEIRA, T. M.S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. Dissertação (Biologia), 111f. Universidade de Aveiro. Aveiro. Portugal. 2010

PACHECO, L.G.C. et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. **Journal of Medical Microbiology**, n.56, p. 480–486, 2007.

PASSAGLIA, L.M.P.; ZAHA, A. Técnicas de DNA recombinante. In: ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado aberto, c. 15, p. 307-331, 2001.

PETTI, C.A, POLAGE, C.R, SCHRECKENBERGER P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **Journal Clinical Microbiology**, n.43, p.6123–6125, 2005

QUINLIVAN, M., DEMPSEY, E., RYAN, F., ARKINS, S., CULLINANE, A. Real-time reverse transcription PCR for detection and quantitative analysis of equine influenza virus. **Journal Clinical Microbiology**, n.43, p.5055–5057, 2005.

REGITANO, A.C.L.; NICIURA, S.C.M.; IBELLI, A.M.G.; GOUVEIA, J.J.S. **Protocolos de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. São Carlos: Embrapa Sudeste, 2007.

ROSSETI, M.L.; SILVA, C.M.D.D; RODRIGUES, J.J.S. **Doenças infecciosas: diagnóstico molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. “Primer3 on the for general users and for biologist programmers”. **Methods in Molecular Biology**, v.132, p. 365-386, 2000.

SACHSE, K.; LAROCAU, K.; VORIMORE, F.; MAGNINO, S.; FEIGE, J.; MÜLLER, W.; KUBE, S.; HOTZEL, H.; SCHUBERT, E.; SLICKERS, P.; EHRICHT, R. DNA microarray genotyping of *Chlamydomytila psittaci* strains from culture and clinical samples. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 22- 30, 2009.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J., HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. Primer - direct enzymatic amplification of de DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SHIN, Y.J., CHO, K.O, CHO, H.S, KANG, S.K., KIM, H.J., KIM, Y.H., PARK, H.S., PARK, N.Y. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 1-2, p. 83-6, 2004.

SINGER, M.S.; MCEVOY, L.M.; BERLIN, C.; BARGATZE, R.F.; BUTCHER, E.C. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. **Nature**, n. 366, p. 695-618, 1993.

SILLIS, M., WHITE, P.M.B. Rapid identification of *Chlamydia psittaci* and TWAR (*C. pneumoniae*) in sputum samples using an amplified EIA. **Journal Clinical Pathology**, n.43, n. 3, p.260, 1990

SLOMKA, M.J., DENSHAM A.L., COWARD, V. J., ESSEN, S., BROOKES, S.M., IRVINE, R.M., SPACKMAN, E., RIDGEON, J., GARDNER, R., HANNA, A., SUAREZ, D.L., BROWN, I.H. Real time reverse transcription (RRT)-polymerase chain reaction (PCR) methods for detection of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus and European swine influenza A virus infections in pigs. **Influenza and other respiratory viruses**, n.4, p. 277–293, 2010.

SOUSA, S.A.P.; PEREIRA-JÚNIOR, R.A.; MARTINS, N.É.X.; ALMEIDA, K.S. Leptospirose e a infecção de ovinos – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, anexo XII, n. 23, 2014.

SOUZA, A.M.; ALMEIDA, D.N.P.; GUTERRES, A.; GOMES, R.; FAVACHO, A.R.M.F.; MOREIRA, N.S.M.; MAIA, L.M.P.; ROZENTAL, T.; TORRES FILHO, R.A.; CERQUEIRA, A.M.F. DE LEMOS, E.R.S.; ALMOSNY, N.R.P. Bartonelose: análise molecular e sorológica em gatos do Rio de Janeiro – Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2010.

SPADETTO, R.M.; DIAS, A.S. Leucose enzoótica bovina – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, anexo XI, N. 20, 2013.

STROTTMANN, D.M. et al. Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.400-405, 2008.

TANG, Y.W.; STRATTON, C.W. **Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology**. Springer. New York, USA. 551p. 2006.

THIELE, D.; WITTENBRINK, M.M.; FISCHER, D.; KRAUSS, H. Evaluation of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Chlamydia psittaci* in abortion material from ewes. **Zentralblatt für Bakteriologie**, n.277, p.446–453, 1992.

VAN BUUREN, C.E., DORRESTEIN, G.M., VAN DIJK, J.E. *Chlamydia psittaci* infections in birds: a review on the pathogenesis and histopathological features. **The Veterinary Quarterly**, n.16, p.38-41, 1994.

VANDER, V. V. H. J. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. **Leukemia**, v. 17, p. 1013–1034, 2003.

VAN ENGELENBURG, F.A.C., VAN SCHIE, F.W., RIJSEWIJK, F.A.M.; VAN OIRSCHOT, J.T. Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen detected much longer by PCR than by virus isolation. **Journal Clinical Microbiology**, n.33, p.308–312, 1995.

WANG, H.; FADL, A.A.; KHAN, M.I. Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. **Molecular and Cellular Probes**, n.11, p.211–216, 1997.

WARFORD, A.; PRINGLE, J.H.; HAY, J.; HENDERSON, S.D.; LAUDER, I. Southern blot analysis of DNA extracted from formal saline fixed and paraffin wax embedded tissue. **The Journal of Pathology**, v.154, p. 313–320, 1988.

WERNIKE, K., HOFFMANN, B., DAUBER, M., LANGE, E., SCHIRMEIER, H., BEER, M. Detection and typing of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus by multiplex real-time RT-PCR. **PLoS One**, v. 7, n. 6, 38251, 2012.