

## Otimização da técnica da PCR para a detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

### Optimization of PCR technique for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Karina Koerich de Souza<sup>I</sup> Catia Silene Klein<sup>III\*</sup> Jalusa Deon Kich<sup>II</sup> Arlei Coldebella<sup>II</sup>  
Geraldo Camilo Alberton<sup>I</sup>

#### RESUMO

A utilização de métodos moleculares baseados em PCR é fundamental na detecção do *Actinobacillus pleuropneumoniae*, sendo capaz de identificar a infecção antes do estabelecimento da doença no rebanho. Estes métodos apresentam maior sensibilidade quando comparados com métodos tradicionais de isolamento bacteriano, mas podem sofrer influência de substâncias que reduzem a especificidade do teste e proporcionam o aparecimento de ampliações inespecíficas. No intuito de reduzir as ampliações inespecíficas, observadas quando aplicada a PCR para o gene *cpx* em amostras de tecido tonsilar, procedeu-se a otimização da técnica, na qual foram analisados o efeito do pré-cultivo bacteriano e as diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores e foi introduzido, no protocolo, um anticorpo que se liga na enzima Taq DNA Polimerase, aumentando a especificidade do teste. Paralelamente, foi realizado um experimento para verificar o efeito inibidor do tecido tonsilar sobre os resultados da PCR. Para isso, porções de tonsila de animais negativos para *A. pleuropneumoniae* foram contaminadas artificialmente com a amostra referência do sorotipo 5B. A adição do anticorpo para a enzima Taq DNA Polimerase e o aumento da temperatura de anelamento dos iniciadores para 57°C diminuiu o aparecimento de ampliações inespecíficas. Os resultados obtidos no experimento demonstraram que o tecido tonsilar possui efeito inibidor nas ampliações da PCR. Além disso, a amplificação depende de, no mínimo, 675 UFC presentes na alíquota da amostra usada na PCR (equivalente a  $1,35 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>), assim, amostras de fragmentos de tecido de infecções iniciais e/ou com poucas células podem apresentar resultados falsos negativos.

**Palavras-chave:** PCR, gene *cpx*, tonsila, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, pleuropneumonia suína.

#### ABSTRACT

The use of molecular methods based on PCR is important in *Actinobacillus pleuropneumoniae* detection, being able to identify the infection before the establishment of the disease in the herd. These methods have larger sensitivity when compared with traditional methods of bacteriological isolation, but they can suffer influence of substances that reduce the specificity of the test and resulting in inespecific amplifications. In order to reduce inespecific amplifications, observed when applied the PCR technique for the gene *cpx* in tonsil's tissue samples, the optimization was performed, in which different annealing temperatures were analyzed and introduced, in the technique, an antibody that binds to the enzyme Taq DNA Polimerase, increasing its specificity. In parallel, an experiment was performed in order to verify the inhibiting effect of the tonsil's tissue on the PCR results. For that, portions of tonsil from animals negative to the *A. pleuropneumoniae* were artificially contaminated with the reference sample of the sorotype 5B. The addition antibody for the enzyme Taq DNA Polimerase and the increase of the primers aneling temperature to 57°C reduced the inespecific amplifications. The results obtained in the experiment demonstrated a possible inhibiting effect of the tonsil's tissue in the PCR amplifications. Besides, amplifications depend on at least 675 UFC present in the aliquot of samples that will be used in PCR (equivalent to  $1.35 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>), therefore, samples tissue's fragments in initial infections and/or with few cells can result in false-negative.

**Key words:** PCR, gene *cpx*, tonsilar tissue, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, porcine pleuropneumonia.

#### INTRODUÇÃO

A pleuropneumonia suína é uma doença infectocontagiosa específica dos suínos, causada pela

<sup>I</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil.

<sup>II</sup>Embrapa Suínos e Aves, 89700-000, BR 153, km 110, CP 21, Distrito de Tamanduá, Concórdia, SC, Brasil. Fone: (49) 3441-0400/Fax: (49) 3442-8559. E-mail: catia@cnpa.embrapa.br. \*Autor para correspondência.

bactéria *Actinobacillus pleuropneumoniae* (FENWICK e HENRY, 1994). As lesões decorrentes da pleuropneumonia são restritas à cavidade torácica, envolvendo pulmões, pleura e, com frequência, pericárdio (MORES et al., 1984). A doença pode cursar com quadro superagudo, agudo, subagudo ou crônico. Os animais que sobrevivem à infecção aguda de pleuropneumonia tornam-se portadores do agente, abrigando o *A. pleuropneumoniae* no trato respiratório, principalmente nas tonsilas e, de modo menos freqüente, na cavidade nasal (NICOLET, 1992; SIDIBÉ et al., 1993). Rebanhos afetados pela pleuropneumonia apresentam consideráveis prejuízos econômicos, principalmente pela redução no ganho de peso diário, pela piora na conversão alimentar, pelas despesas com medicação, vacinação, serviços veterinários e pela condenação de carcaças no abatedouro (HUNNEMAN, 1986).

Técnicas moleculares para o diagnóstico da pleuropneumonia, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), são ferramentas promissoras para um rápido diagnóstico etiológico, oferecendo várias vantagens quando comparada com testes utilizados na rotina de laboratório (MURDOCH, 2003). A PCR baseada no gene *cpx*, responsável pelo transporte de cápsula, permite a amplificação de todos os sorotipos do *A. pleuropneumoniae*, exceto o sorotipo 4. No Brasil, onde há poucos dados sobre o isolamento do sorotipo 4 causando pleuropneumonia, sua aplicação é uma boa alternativa para o diagnóstico e para definir o *status* da granja (KLEIN et al., 2003).

A técnica de PCR utilizando como alvo o gene *cpx* foi otimizada e aplicada em isolados de *A. pleuropneumoniae* de casos clínicos brasileiros por KLEIN et al. (2003). Posteriormente, KUCHIISHI (2003) adaptou a metodologia para amostras biológicas de suínos com infecção experimental e natural. Nesta fase do estudo foram observadas ampliações inespecíficas e baixa sensibilidade, necessitando de novos estudos. Com o objetivo de adequar a técnica e reduzir as ampliações inespecíficas observadas quando aplicada em amostras de biópsia tonsilar, o teste de PCR<sub>*cpx*</sub> foi otimizado. Foi avaliada a interferência do tecido tonsilar na sensibilidade do teste, analisadas diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores e foi utilizado um anticorpo para a enzima *Taq* DNA Polimerase para aumentar a especificidade do teste.

## MATERIAL E MÉTODOS

Contaminação experimental de tecido tonsilar

O efeito inibidor do tecido tonsilar sobre os resultados da PCR<sub>*cpx*</sub> foi avaliado por um experimento

de contaminação artificial de tonsilas com suspensão do cultivo de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 5B padronizado para conter  $1,5 \times 10^9$  de Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC mL<sup>-1</sup>) e com posterior diluição na base 10. As tonsilas foram extraídas de dois suínos *Specific Pathogen Free* (SPF) negativos no teste de ELISA para antígeno lipopolissacarídeo cadeia longa (LPS-CL) polivalente para os sorotipos 3, 5 e 7 de *A. pleuropneumoniae* (MACHADO et al., 2001). Tais tonsilas apresentaram resultados negativos no isolamento bacteriológico tradicional (IBT) e na PCR<sub>*cpx*</sub> para *A. pleuropneumoniae* sem etapa de pré-enriquecimento.

Neste experimento (Tabela 1), foram testadas duas variáveis: quantidade de tecido tonsilar de 1, 2 e 3 porções coletadas com pinça de biópsia e concentração inicial de células a partir de suspensões bacterianas nas concentrações de  $1,9 \times 10^6$  e  $1,9 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 5B. Além dos tratamentos controles (T1, T2 e T3), o experimento teve o delineamento fatorial 3 x 3 (T4 ao T12), conforme segue: T1 (NaCl 0,85% - salina estéril) como controle negativo; T2 e T3, sendo adicionados 100µL das suspensões bacterianas de  $1,9 \times 10^6$  e  $1,9 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente, como controles positivos; T4, T5 e T6 (uma, duas e três porções de tonsila, respectivamente), todos com salina estéril; T7, T8 e T9 (uma, duas e três porções de tonsila, respectivamente), cada porção de tonsila foi contaminada artificialmente com 100µL da suspensão de  $1,9 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>; T10, T11 e T12 (uma, duas e três porções de tonsila, respectivamente), cada porção de tonsila foi contaminada artificialmente com 100µL da suspensão  $1,9 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>. Foram realizadas 10 repetições por tratamento.

As porções de tonsila foram maceradas, armazenadas em microtubos, e acrescidas de 100µL de solução salina ou das suspensões bacterianas por porção, de acordo com o tratamento (Tabela 1), nas quais permaneceram por 30 minutos a 37°C para possibilitar o contato da bactéria com o tecido, incluindo os tratamentos controles (T1, T2 e T3). Posteriormente, foram adicionados a 5mL de caldo seletivo Lincomicina-Bacitracina (LB) (PIJOAN et al., 1983) e incubados a 37°C por 24 horas, como uma etapa de pré-enriquecimento para aumentar a população original e possibilitar a detecção do *A. pleuropneumoniae*, caso haja quantidade de bactérias abaixo do limite de detecção na amostra original. A concentração anterior à incubação em caldo LB/mL, desconsiderando o período de contato entre tecido tonsilar e suspensão bacteriana (30min a 37°C)

em alguns tratamentos foi estimada como segue: T2=3,8 X 10<sup>4</sup>UFC mL<sup>-1</sup>; T3=3,8 X 10<sup>1</sup>UFC mL<sup>-1</sup>; T7=3,8 X 10<sup>4</sup>UFC mL<sup>-1</sup>; T8=7,6 X 10<sup>4</sup>UFC mL<sup>-1</sup>; T9=1,1 X 10<sup>5</sup>UFC mL<sup>-1</sup>; T10=3,8 X 10<sup>1</sup>UFC mL<sup>-1</sup>; T11=7,6 X 10<sup>1</sup>UFC mL<sup>-1</sup> e T12=1,1 X 10<sup>2</sup>UFC mL<sup>-1</sup>. Após o período de incubação, foi extraído DNA de 1ml do cultivo de cada tratamento e realizada PCR para o gene *cpx*.

#### Condições do teste

A otimização da PCR *cpx* foi realizada na Embrapa Suínos e Aves, onde 13 amostras padrão de *A. pleuropneumoniae*, representando os sorotipos um ao 12 (incluindo 5A e 5B), foram submetidas a quatro diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores, sendo estas a 54, 55, 56 e 57°C. As demais condições do teste foram de acordo com KLEIN et al. (2003).

A adição de um anticorpo que se liga na enzima *Taq* DNA Polimerase foi testada pela comparação em sete amostras de biopsia tonsilar provenientes da mesma tonsila, coletadas com pinça de biopsia, onde cada porção de tonsila foi artificialmente contaminada com 100µL de uma suspensão do cultivo de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 5B contendo aproximadamente 1,9 x 10<sup>5</sup>UFC (dados não mostrados).

A técnica de extração do DNA de *A. pleuropneumoniae* utilizada em todas as etapas foi descrita por FAN et al. (1995) e modificada por KUCHIISHI (2003) e os iniciadores para o gene *cpx* foram definidos por LO et al. (1998). A reação para um volume final de 25µL foi padronizada para conter: 5µL de amostra de DNA; 10mM de Tris-HCl (pH 8,3); 50mM de KCl; 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP's); 30pmol de cada iniciador *cpx*; 0,2µL (1 Unidade) de enzima *Taq* DNA polimerase; 0,2µL de anticorpo da *Taq* DNA Polimerase (*Platinum*<sup>®</sup> *Taq* *Antibody*, Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies).

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (Mastercycler<sup>®</sup> Gradiente, Eppendorf) nas seguintes condições de temperatura e tempo: o DNA foi desnaturado com uma etapa a 94°C por cinco minutos e amplificado por 30 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento dos iniciadores de acordo com as temperaturas testadas (54 a 57°C) por 45 segundos e polimerização a 72°C por dois minutos. Depois de completados os 30 ciclos, uma etapa final consistia de anelamento por cinco minutos e polimerização a 72°C por 10 minutos. A cada teste realizado, foram adicionados um controle positivo (amostra referência de *A. pleuropneumoniae*) e um controle negativo (reação de PCR sem DNA).

Após amplificação em termociclador, 6µL das amostras foram submetidas à separação por eletroforese, por aproximadamente 60 minutos, em gel de agarose na concentração de 1,5% corado com brometo de etídio (0,5µg mL<sup>-1</sup>) (TAYLOR, 1993). Paralelamente às amostras, um marcador de peso molecular de 100 pb foi aplicado. O tampão Tris-EDTA-ácido bórico (TBE) na concentração de 1X foi utilizado para a corrida eletroforética (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Os produtos resultantes da amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados para análise.

#### Determinação da sensibilidade e especificidade do teste

O teste de sensibilidade, para determinar a concentração mínima de bactérias presentes para contagem e determinação das UFC mL<sup>-1</sup>, foi realizado utilizando a amostra referência de *A. pleuropneumoniae* sorotipo 5A, sendo cultivada em meio agar Nicolet. Após o cultivo, as diluições bacterianas foram realizadas em solução salina a partir da concentração inicial referente ao tubo 5 da escala *MacFarland* (equivalente a 1,5x10<sup>9</sup>UFC mL<sup>-1</sup>) e foram realizadas diluições seriadas na base 10 até 10<sup>-12</sup>. Em seguida, 100µL de cada diluição foram semeados em três placas de Petri contendo meio de cultura agar Nicolet. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas em condição microaerófila para posterior contagem das UFC. Paralelamente, de cada diluição da suspensão bacteriana, foi retirado 1mL para extração de DNA e realização da PCR, sem etapa de pré-enriquecimento.

No teste de especificidade da PCR *cpx*, foram utilizadas as seguintes amostras de bactérias presentes no trato respiratório dos suínos, tanto patogênicas como não-patogênicas, que podem interferir no teste diagnóstico: *A. minor*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *A. porcinus*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus suis* (KLEIN et al., 2003) e foi incluído isolado de campo de *A. indolicus*, pertencente à bacterioteca da Embrapa Suínos e Aves.

#### Seqüenciamento do produto amplificado por PCR *cpx*

Um fragmento de DNA de 715 pb amplificado por PCR *cpx* a partir de um isolado de campo, purificado de gel de agarose pelo kit Concert<sup>™</sup> Nucleic Acid Purification System (Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies), foi seqüenciado. A reação de seqüenciamento foi realizada com o kit Big Dye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 3.0 v (Applied Biosystems -ABI) e após amplificação do DNA, 2µL da reação foram submetidos à eletroforese no seqüenciador *ABI PRISM*<sup>®</sup>.

377 DNA Sequencers (ABI). As condições do preparo da amostra foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante do *kit* e do equipamento. Após seqüenciamento do DNA, a leitura foi comparada com o banco de dados *GenBank*<sup>®</sup> (GENBANK OVERVIEW), por meio da ferramenta Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST), para verificar o grau de similaridade desse isolado com as seqüências depositadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os procedimentos adotados na otimização da PCR<sub>cpx</sub>, a temperatura de 57°C para anelamento dos iniciadores minimizou a amplificação de bandas inespecíficas. A otimização da PCR<sub>cpx</sub> permitiu a amplificação de um produto de 715 pb em todas as amostras referência de *A. pleuropneumoniae*, exceto o sorotipo 4, como observado por LO et al. (1998), KLEIN (2003) e FITTIPALDI et al. (2003). A adição do anticorpo que se liga no sítio ativo da enzima *Taq* DNA Polimerase inibiu a presença de amplificações inespecíficas observadas na aplicação do teste em amostras de biopsia de tonsila, não afetando a amplificação nem a intensidade do produto de 715pb, correspondente ao gene *cpx* do *A. pleuropneumoniae*.

Estas amplificações provavelmente são originadas de outros contaminantes presentes na microbiota das tonsilas, sendo que a quantidade de produtos inespecíficos varia de acordo com o meio utilizado no pré-cultivo das amostras e variam entre rebanhos (GRAM et al., 1996). Quando ocorre a ligação do anticorpo na enzima *Taq* DNA Polimerase, em temperatura ambiente, esta tem seu sítio ativo bloqueado durante a preparação da reação do teste da PCR, sendo desbloqueado somente após atingir a temperatura de desnaturação da fita de DNA (94°C). Sendo assim, há redução de amplificações inespecíficas que, normalmente, ocorrem com temperaturas mais baixas e por este motivo este método é tipicamente utilizado para aumentar especificidade do teste (Invitrogen™ Life Technologies).

No teste de sensibilidade da PCR<sub>cpx</sub>, o limite de detecção médio de seis repetições foi de 675UFC na alíquota de DNA usada na PCR (correspondente a 1,35 x 10<sup>5</sup>UFC mL<sup>-1</sup>). Esta quantidade foi elevada quando comparada a 100UFC mL<sup>-1</sup>, encontradas por LO et al. (1998), utilizando o mesmo iniciador. Neste teste, na sétima repetição, o limite detectado pela PCR<sub>cpx</sub> foi de 500UFC mL<sup>-1</sup>, entretanto, não foi considerado na média, uma vez que esta quantidade não foi detectada nas repetições anteriores, demonstrando que o teste pode detectar menor quantidade de células, porém, sem

repetibilidade. Em registros utilizando teste de PCR convencional para detecção de *A. pleuropneumoniae*, o menor número de UFC mL<sup>-1</sup> (50) foi detectado por GRAM e AHRENS (1998) utilizando iniciador para o gene *omlA*. Anteriormente, GRAM et al. (1996) haviam detectado 500UFC/mL utilizando iniciador universal. LO et al. (1998), com a PCR multiplex, detectaram 100UFC mL<sup>-1</sup> de *A. pleuropneumoniae*. Porém, estes estudos não apresentam resultados de repetições do teste de sensibilidade. Segundo GRAM et al. (1996), valores tão baixos são difíceis de serem obtidos em testes diagnósticos, provavelmente como resultado da incompleta extração de DNA, inibição da DNA polimerase ou atividade de DNase's em alguma etapa do procedimento.

O resultado do teste de especificidade mostrou que somente nas amostras referência de *A. pleuropneumoniae* foi visualizado um produto de 715pb e nenhum outro fragmento de amplificação foi observado nas amostras de outras espécies bacterianas utilizadas no teste, conforme constatado por KLEIN et al. (2003) e FITTIPALDI et al. (2003). A especificidade é essencial para a validação do resultado positivo. A partir deste resultado, é possível concluir que a técnica de PCR<sub>cpx</sub> apresenta alta especificidade, podendo ser aplicada na caracterização da espécie em casos clínicos de pleuropneumonia, considerando que, quando o resultado for negativo, outro teste diagnóstico deve ser utilizado para a identificação do sorotipo 4, uma vez que, segundo KUCHIISHI et al. (2005), este vem sendo isolado no Brasil.

O produto amplificado pela PCR<sub>cpx</sub>, proveniente de isolado de caso clínico, foi seqüenciado e apresentou similaridade de 93,39% com a seqüência do gene *cpxCB* do *A. pleuropneumoniae* depositada no *GenBank*<sup>®</sup> sob registro nº U36397 (GENBANK OVERVIEW), confirmando a especificidade do iniciador utilizado no teste para a detecção do agente. Embora com sensibilidade em nível abaixo do esperado, na maioria das repetições, o iniciador apresenta alta especificidade.

Nos resultados da contaminação experimental de tecido tonsilar (Tabela 1), as suspensões bacterianas sem adição de tecido (T2 e T3) apresentaram resultados positivos em todas as repetições, independente da concentração bacteriana inicial no caldo LB (3,8 X 10<sup>4</sup> e 3,8 X 10<sup>1</sup>UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Os tratamentos à base de solução salina (T1) e com adição de tecido tonsilar (T4, T5 e T6), sem suspensão bacteriana, apresentaram resultados negativos em todas as repetições, conforme o esperado, demonstrando a especificidade do teste.

Tabela 1 - Detecção de *Actinobacillus pleuropneumoniae* pela PCR<sub>cpx</sub> a partir diferentes concentrações bacterianas e número de porções de tecido tonsilar, presentes na amostra.

Tratamento	Material	Porção de tecido	Concentração bacteriana (Inicial no LB)	-----Resultados (por repetição)-----										
				1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	
T1	Salina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	Bactéria	-	3,8 x 10 <sup>4</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T3	Bactéria	-	3,8 x 10 <sup>1</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T4		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T5		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T6		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T7		1	3,8 x 10 <sup>4</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T8	Tecido tonsilar	2	7,6 x 10 <sup>4</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T9		3	1,1 x 10 <sup>5</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T10		1	3,8 x 10 <sup>1</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
T11		2	7,6 x 10 <sup>1</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
T12		3	1,1 x 10 <sup>2</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+

A contaminação artificial de tonsila também demonstrou que, na presença de uma elevada concentração inicial de bactérias antes do pré-cultivo (T7, T8 e T9, contendo 3,8 X 10<sup>4</sup>, 7,6 X 10<sup>4</sup> e 1,1 X 10<sup>5</sup>UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente), na presença de tecido tonsilar, todas as 10 repetições foram positivas na PCR<sub>cpx</sub>, indicando que o tecido não inibiu a amplificação. Quando foi reduzida a concentração inicial de bactérias antes do pré-cultivo (T10, T11 e T12, contendo 3,8 X 10<sup>1</sup>, 7,6 X 10<sup>1</sup>, 1,1 X 10<sup>1</sup>UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente), na presença de tecido tonsilar, foi observada a influência negativa do tecido pela inibição da amplificação da PCR<sub>cpx</sub> em 66,7% (20/30 repetições) dos resultados. Embora as concentrações bacterianas iniciais estavam abaixo do limite de detecção do teste, após a etapa de pré-cultivo submetida, o número de bactérias aumentou para níveis detectáveis pelo teste.

Os resultados obtidos neste experimento indicam que houve efeito inibidor do tecido tonsilar na amplificação da PCR<sub>cpx</sub> e que foi, provavelmente, devido à presença de substâncias inibidoras presentes na amostra coletada, como enzimas e sangue. Esse resultado concorda com WILSON (1997), em um estudo dos fatores inibitórios das amplificações dos ácidos nucleicos, em que foi observado que esta técnica pode ser afetada pela presença de substâncias que podem interferir nos resultados do teste, na qual variam com o tipo de amostra testada, como também observado por SAVOYE et al. (2000), utilizando lavado traqueobronquial para detecção do *A. pleuropneumoniae*, além de sofrer a interferência da microbiota concomitante. Outros testes são necessários para verificação da inibição tecidual nos resultados da PCR e é importante o uso de controles

internos para comprovação deste efeito, evitando assim resultados falsos negativos.

Embora a PCR apresente maior sensibilidade, quando comparada com métodos tradicionais de isolamento, este fato deve ser considerado na otimização da técnica. Por isso, a etapa de pré-enriquecimento em meio seletivo favorece o crescimento da bactéria-alvo, possibilitando maior número de detecção do agente em questão e reduzindo possíveis resultados falsos negativos.

Os resultados obtidos, nas diferentes etapas do estudo, indicam que a técnica otimizada em isolados de *A. pleuropneumoniae* para amostras de tecido animal é crítica. Para MØLLER et al. (1993), a biopsia de tecido tonsilar é o material de eleição na detecção do *A. pleuropneumoniae*, pois obtém melhores resultados quando comparado com suabe de tonsila e/ou cavidade nasal, porém, sofre influência dos efeitos inibidores de substâncias presentes do tecido tonsilar (WILSON, 1997) e depende do número de bactérias presentes na reação (FITTIPALDI et al., 2003). Para aumentar a população da bactéria-alvo pode ser utilizado um sistema de enriquecimento com meio de cultura seletivo LB que inibe a flora concorrente e favorece a detecção do agente, resultando em maior número de resultados positivos na PCR quando comparado com meios não-seletivos (KUCHIISHI et al., 2003). Com relação à quantidade de material tonsilar por amostra, a menor quantidade de tecido tonsilar obtido pela biopsia possui proporcionalmente menor quantidade de bactérias (SAVOYE et al., 2000; FITTIPALDI et al., 2003). Este fato foi constatado no experimento realizado com contaminação artificial de tonsilas, em que o maior número de porções de tecido tonsilar utilizado

proporcionou o aumento de resultados positivos na amplificação (T10, T11 e T12), sendo o número de reações positivas dois, três e cinco, respectivamente, observadas em 10 repetições. Estes resultados podem ser explicados pelo aumento no número inicial de bactérias, uma vez que os tratamentos 11 e 12 receberam, respectivamente, duas e três vezes mais bactérias do que o tratamento 10, proporcionalmente ao número de porções de tonsila. Segundo MØLLER et al. (1993), mesmo com o efeito negativo do tecido tonsilar, este órgão continua sendo a amostra de eleição para identificação do *A. pleuropneumoniae*.

## CONCLUSÃO

Os procedimentos adotados na otimização da técnica de PCR<sub>cpx</sub> reduziram a presença de amplificações inespecíficas observadas quando o teste foi aplicado em amostras clínicas.

Amostras de fragmentos de tecido tonsilar de infecção inicial ou com poucas células podem resultar em falsos negativos. A etapa de pré-enriquecimento bacteriológico da amostra, realizada anteriormente à técnica de PCR<sub>cpx</sub>, possibilita o aumento da população original, inibe a flora concorrente e favorece a detecção do agente, resultando em maior número de resultados positivos.

## REFERÊNCIAS

- BLAST. **Basic Local Alignment and Search Tool**. Capturado em 21 jan. 2005. Online. Disponível por: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- FAN, H.H et al. Application of polymerase chain reaction with arbitrary to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v.39, p.729-735, 1995.
- FENWICK, B.; HENRY, S. Porcine pleuropneumonia. **Journal the American Veterinary Medical Association**, v.204,n.9, p.1334-1340, 1994.
- FITTIPALDI, N. et al. Evaluation and field validation of PCR tests for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in subclinically infected pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.11, p.5085-5093, 2003.
- GENBANK OVERVIEW. Capturado em 21 de jan. 2005. Online. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>.
- GRAM, T. et al. Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. **Veterinary Microbiology**, v.51, p.95-104, 1996.
- GRAM, T.; AHRENS, P. Improved diagnostic PCR assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* based on the nucleotide sequence of an outer membrane lipoprotein. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.2, p.443-448, 1998.
- HUNNEMAN, W.A. Incidence, economic effects, and control of *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in pigs. **Veterinary Quarterly**, v.8, n.1, p.83-87, 1986.
- KLEIN, C.S. et al. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR on field strains from healthy and diseased pigs. **Current Microbiology**, v.46, p.443-447, 2003.
- KUCHIISHI, S.S. **Avaliação de ensaio imunoenzimático indireto, isolamento bacteriológico tradicional e Reação em Cadeia da Polimerase no diagnóstico da pleuropneumonia suína**. 2003. 72f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Clínica Médica Veterinária, Universidade Estadual Paulista.
- KUCHIISHI, S.S. et al. Sorotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolados no Brasil de 1993 a 2005. In: CONGRESSO DA ABRAVES, 12, 2005, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005. 576p. p.26-27.
- LO, T.M. et al. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.1704-1710, 1998.
- MACHADO, H.G. et al. Avaliação de testes de ELISA para o diagnóstico sorológico de infecções pelos sorotipos 3, 5 e 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* em suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.513-522, 2001.
- MØLLER, K. et al. Optimization of the detection of NAD dependent *Pasteurellaceae* from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. **Veterinary Microbiology**, v.36, p.261-271, 1993.
- MORES, N. et al. Estudo experimental a pleuropneumonia suína causada por *Haemophilus pleuropneumoniae* (Hpp). Patogenicidade e evolução das lesões anatomo-patológicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.36, n.6, p.679-693, 1984.
- MURDOCH, D.R. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. **Medical Microbiology**, n.36, p.11620-11700, 2003.
- NICOLET, J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: LEMAN, et al. **Diseases of swine**. Iowa: Iowa State University, 1992. p.401-413.
- PIJOAN, C. et al. Dilution technique for isolation of *Haemophilus* from swine lungs collected at slaughter. **Journal of Clinical Microbiology**, v.18, n.1, p.143-145, 1983.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 2344p.
- SAVOYE, C. et al. A PCR assay used to study aerosol transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from samples of live pigs under experimental conditions. **Veterinary Microbiology**, v.73, p.337-347, 2000.
- SIDIBÉ, M. et al. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the upper respiratory tract as a complement to serological tests. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.57, p.204-208, 1993.
- TAYLOR, G.R. Polymerase Chain Reaction: basic principles and automation. In: MCPHERSON, M.J. et al. **PCR: a practical approach**. New York: Oxford University, 1993. p.15-16.
- WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied Environment Microbiology**, v.63, n.10, p.3741-3751, 1997.