



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS DE CURITIBANOS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

COORDENADORIA ESPECIAL DE BIOCÊNCIAS E SAÚDE ÚNICA

Sarah Maria van Tol Amaral Guerra

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO PCR *MULTIPLEX* PARA DETECÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS - REVISÃO DE
LITERATURA**

Curitibanos
2022

Sarah Maria van Tol Amaral Guerra

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO PCR *MULTIPLEX* PARA DETECÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS - REVISÃO DE
LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sandra Arenhart.

Curitibanos
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Guerra, Sarah Maria van Tol Amaral Guerra
DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO PCR *MULTIPLEX* PARA DETECÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS : REVISÃO DE
LITERATURA / Sarah
Maria van Tol Amaral Guerra Guerra ; orientador, Sandra
Arenhart Arenhart, 2022.
37 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Medicina Veterinária,
Curitibanos, 2022.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária. 2. Medicina veterinária. 3.
PCR. 4. *Multiplex*. 5. Diagnóstico diferencial. I. Arenhart,
Sandra Arenhart. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

Sarah Maria van Tol Amaral Guerra

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO PCR *MULTIPLEX* PARA DETECÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO DE AGENTES ETIOLÓGICOS - REVISÃO DE
LITERATURA**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária e aprovado em sua forma final pela Banca Examinadora.

Curitiba, 19 de Dezembro de 2022.

Prof. Malcon Andrei Martinez Pereira, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a. Sandra Arenhart, Dr^a.
UFSC

Prof^a. Viviane Glaser, Dr^a.
UFSC

Prof. Álvaro Menin, Dr.
UFSC

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha mãe, por criar em mim os fundamentos de uma vida digna: perseverança, paciência, empatia e força. Sem a certeza do seu apoio, eu não conseguiria alcançar tanto nesta vida. Você sempre será o meu Rochedo de Gibraltar.

Agradeço também ao meu pai, cujo empenho e dedicação ao trabalho e à ciência sempre me foram admiráveis. Aos meus irmãos, Matheus, Pedro e João, sou infinitamente grata pelos exemplos que me deram durante toda a vida. Somos quatro, porém, somos ao mesmo tempo uma unidade.

À minha orientadora, Prof^a Sandra Arenhart, serei eternamente grata por ter instigado em mim a curiosidade para iniciar na virologia veterinária e permitir o início de uma profissão.

À minha orientadora de iniciação científica Prof^a Viviane Glaser, não poderia deixar de agradecer por todo o incentivo dado a mim logo no início da graduação. Sinto que sua dedicação ao me ensinar permitiu que eu percebesse minha própria capacidade.

Ao Setor de Virologia, agradeço a tudo, os colegas de equipe, à infinita possibilidade de aprendizado e, principalmente, aos professores Eduardo Furtado Flores e Rudi Weiblen. Esta oportunidade foi determinante para que eu pudesse me certificar que a virologia veterinária é parte de meu objetivo profissional.

Às minhas amigas Theopi, Emily e Talita, obrigada por me ensinarem o significado de uma verdadeira amizade, não apesar de todas as diferenças, mas devido a isso.

“Quando alguém encontra algo de que verdadeiramente necessita, não é o acaso que tal proporciona, mas a própria pessoa; seu próprio desejo e sua própria necessidade a conduzem a isso.”

(Hermann Hesse)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de realizar uma revisão de literatura sobre o desenvolvimento de ensaios PCR *Multiplex* e evidenciar as possíveis afecções que podem ser beneficiadas com esta técnica. Será abordada a metodologia necessária para a escolha dos agentes etiológicos, *primers* necessários para a amplificação, que tipos de amostras podem ser utilizadas, como realizar a extração de ácidos nucleicos, isolar e identificar o patógeno, como otimizar e padronizar as reações, como estipular a sensibilidade, especificidade, validação do teste e como solucionar as restrições que podem ocorrer. Os benefícios do desenvolvimento da técnica envolvem a facilidade no diagnóstico diferencial de doenças com sinais clínicos semelhantes, rapidez nos resultados e menor uso indiscriminado de medicamentos.

Palavras-chave: PCR, *Multiplex*, Diagnóstico diferencial, Agentes etiológicos.

ABSTRACT

The goal of this paper is to carry out a literature review on the development of *Multiplex* PCR assays and highlight the possible diseases that can benefit from this technique. The necessary methodology for choosing the etiological agents, the *primers* needed for amplification, what types of samples can be used, how to extract nucleic acids, isolate and identify the pathogen, how to stipulate the sensitivity, specificity, validation of the assay and how to solve restricting issues that may occur. The development of this technique benefits the differential diagnosis of diseases with similar clinical signs, the speed of results and less indiscriminate use of medication.

Keywords: PCR, *Multiplex*, Differential diagnosis, Etiological agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da reação em cadeia da polimerase	22
Figura 2. Esquematização de eletroforese em gel de agarose mPCR.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mix para reação de PCR para o vírus da cinomose (CDV).....	23
Tabela 2. Mix para reação de PCR para parainfluenzavírus tipo 5 (PIV-5).....	23
Tabela 3. Mix para reação de PCR para rotavírus (CRV).....	24
Tabela 4. Mix para <i>Multiplex</i> – sistema gastrointestinal de bovinos.....	24
Tabela 5. Protocolo de amplificação mPCR – eletroforese em gel de agarose.....	25
Tabela 6. <i>Primers</i> – doenças respiratórias e entéricas de caninos.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Amostra positiva

Amplicon - produto da amplificação

°C - Graus Celsius

C+ - Controle positivo

C- ext - Controle negativo da extração

C- mix - Controle negativo da mistura

µL - Microlitro

BCV F - Iniciador senso para coronavírus bovino

BCV R - Iniciador antisenso para coronavírus bovino

BoHV-1 - Hespesvírus bovino tipo -1

BVDV-1 - Vírus da diarreia viral bovina tipo - 1

BVDV-2 - Vírus da diarreia viral bovina tipo - 2

BVDV-3 - Vírus da diarreia viral bovina tipo - 3

BRV F - Iniciador senso para rotavírus bovino

BRV R - Iniciador antisenso para rotavírus bovino

CanineCV - Circovírus canino

CanineCV F - Iniciador senso para circovírus canino

CanineCV R - Iniciador antisenso para circovírus canino

CAV - 2 - Adenovírus canino tipo 2

CAV - 2 - F^a - Iniciador senso para adenovírus canino tipo 2

CAV - 2 - R^b - Iniciador antisenso para adenovírus canino tipo 2

CCoV - Coronavírus canino

CcoV F - Iniciador senso para coronavírus canino

CcoV R - Iniciador antisenso para coronavírus canino

CDV - Vírus da cinomose canina

CDV F - Iniciador senso para vírus da cinomose canina

CDV R - Iniciador antisenso para vírus da cinomose canina

CIV - Vírus da gripe canina

CIV F - Iniciador senso para vírus da gripe canina

CIV R - Iniciador antisenso para vírus da gripe canina

CPIV - Vírus da parainfluenza canina

CPIV F - Iniciador senso para vírus da parainfluenza canina

CPIV R - Iniciador antisenso para vírus da parainfluenza canina
CPV - Parvovírus canino
CPV F - Iniciador senso para parvovírus canino
CPV R - Iniciador antisenso para parvovírus canino
CRY F - Iniciador senso para *Cryptosporidium parvum*
CRY R - Iniciador antisenso para *Cryptosporidium parvum*
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dNTPs - Desoxinucleotídeos trifosfatos
ELISA - Ensaio imunoenzimático
IFA - Imunofluorescência
K99 F - Iniciador senso para *Escherichia coli*
K99 R - Iniciador antisenso para *Escherichia coli*
Kb - quilobite
L - *Leptospira spp.*
MA - Marcador
mg - Miligrama
MG - Magnésio
min - Minutos
mix - Mistura
mPCR - Reação em cadeia da polimerase *multiplex*
MT - Material genético
N - *Neospora caninum*
pb - Pares de base
PCR - Reação em cadeia da polimerase
pH - Potencial Hidrogeniônico
Primer - Iniciador
Primer F - Iniciador senso
Primer R - Iniciador antisenso
RNA - Ácido ribonucleico
RNase free - Livre de enzimas que degradam RNA
Rpm - Rotações por minuto
s - Segundos
Sal F - Iniciador senso para *Salmonella enterica*
Sal R - Iniciador antisenso para *Salmonella enterica*

TCID₅₀ - *Tissue culture infection dose*

Taq - Taq DNA polimerase

TE - Tris-EDTA

Trizol - Solução monofásica de tiocianato de guanidina e fenol

VT - Volume total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.2 Objetivo	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Afecções do sistema digestivo	17
2.2 Afecções do sistema reprodutivo	18
2.3 Afecções do sistema respiratório	19
3 METODOLOGIA	20
3.1 Cepas víricas, bactérias e parasitas	23
3.2 <i>Primers</i>	24
3.3 Amostras clínicas	25
3.4 Extração de ácidos nucleicos.....	26
3.5 Isolamento e identificação.....	27
3.6 Padronização e otimização das reações individuais vs. <i>Multiplex</i>	27
3.7 Sensibilidade e especificidade analítica e diagnóstica.....	28
3.8 Validação de um ensaio de PCR <i>Multiplex</i>	28
4 POSSÍVEIS RESTRIÇÕES E SOLUÇÕES.....	29
5 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

A reação em cadeia da polimerase *Multiplex* é uma variação da PCR convencional, nela é possível amplificar duas ou mais sequências alvo através do uso de pares de *primers* específicos em uma mesma reação (MARKOULATOS *et al.*, 2002). Com a PCR *Multiplex* é possível economizar tempo, esforço e gastos, sem que haja diminuição na qualidade diagnóstica da técnica. No campo das doenças infecciosas, é um método que se mostrou eficaz para diferenciação e diagnóstico diferencial de agentes etiológicos víricos, bacterianos, fúngicos e parasitários (ELNIFRO *et al.*, 2000).

A padronização e otimização de um ensaio PCR *Multiplex* impõe certas dificuldades, tais quais, amplificação preferencial de determinadas partes específicas do material genético, menor sensibilidade e especificidade. A necessidade de utilização de mais de um par de *primers* aumenta as chances de amplificação de produtos não específicos, devido à formação de dímeros (MARKOULATOS *et al.*, 2002). Para evitar-se que ocorra essas amplificações, a proporção existente de *primers* deve ser ideal à quantidade de material genético (RUANO *et al.*, 1989).

O ensaio PCR *Multiplex* deve obter os graus de especificidade e eficiência mais próximos possíveis aos da reação individual. O problema da formação de dímeros inespecíficos pode ser contornado com a troca dos primers que causaram esta amplificação. Como resultado, é possível desenvolver ensaios PCR *Multiplex* altamente específicos, que permitem a amplificação de alvos no material genético de diferentes agentes etiológicos (CHAMBERLAIN, 1994).

Métodos convencionais de diagnóstico como culturas bacterianas, ELISA (ensaio imunoenzimático), IFA (imunofluorescência), isolamento em cultivo celular, soroneutralização ou ensaios PCRs para alvos individuais consomem tempo, mão de obra qualificada e necessitam de pessoas com treinamento técnico e científico específico para desenvolver cada uma destas técnicas. Devido a essas limitações, o desenvolvimento de ensaios PCR para múltiplos alvos foi elaborado. Com o PCR *Multiplex* é possível detectar uma ampla categoria de agentes patogênicos,

dentre elas bactérias, vírus e parasitas, resultando em menor custo; além de ser mais eficiente e também permitir o diagnóstico de coinfeções em um mesmo momento (CHANG *et al.*, 2021).

A técnica pode ser utilizada como diagnóstico diferencial para doenças com sintomas clínicos semelhantes, ou pode ser o ponto de partida para maiores investigações como hibridização ou sequenciamento. Independentemente da utilização deste tipo de ensaio, é benéfico quando há a amplificação de múltiplos fragmentos genéticos simultaneamente, pois ocorre economia de tempo e custos (EDWARDS, 1994).

Infecções do sistema digestivo, reprodutivo e respiratório são muito comuns na veterinária, podem causar sintomas clínicos inespecíficos que não sejam capazes de diferenciar o agente etiológico da doença com apenas anamnese e exames físicos de rotina, além disso, muitas infecções acontecem devido à infecção por múltiplos patógenos. Devido à isso, o diagnóstico diferencial feito de forma rápida e precisa é importante para permitir tratamento adequado e implementação de protocolos adequados de manejo para prevenção (HAO *et al.*, 2019).

1.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica a respeito do desenvolvimento da técnica de PCR *Multiplex*, onde é possível a detecção simultânea de diferentes agentes etiológicos. Serão abordadas as metodologias necessárias de desenvolvimento da técnica para diferentes patógenos, a escolha de *primers* a partir da literatura, tipos de amostras clínicas que podem ser utilizadas, e as etapas para padronização e otimização da técnica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A escolha dos agentes etiológicos que serão alvo do PCR *Multiplex* é uma etapa crucial para o desenvolvimento do ensaio. A técnica permite o diagnóstico diferencial de doenças com sinais clínicos semelhantes; dessa forma, para início

do delineamento é interessante que seja feito um estudo epidemiológico de doenças prevalentes em determinada região. Alguns diagnósticos para agentes patogênicos que podem se beneficiar com o desenvolvimento de um PCR *Multiplex* são afecções do sistema digestivo (rotavírus bovino, coronavírus bovino, vírus da diarreia viral bovina, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringes*, *Cryptosporidium*, *Giardia duodenalis*, *Eimeria*) (DALL AGNOL *et al.*, 2021), do sistema reprodutivo (BoHV-1, BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3, *Neospora caninum*, *Leptospira spp.*) (MACLACHLAN, 2011) e do sistema respiratório (herpesvirus bovino-1, vírus respiratório sincicial bovino, parainfluenza bovina-3) (ELLIS, 2001). Dentro de cada sistema, os patógenos produzem sinais clínicos semelhantes e as técnicas para diagnóstico mais utilizadas atualmente detectam apenas um agente por vez.

2.1 Afecções do sistema digestivo

Dentre as afecções do sistema digestivo que acometem os animais, a diarreia neonatal bovina é uma das doenças mais prevalentes na bovinocultura. Possui etiologia que envolve aspectos nutricionais, ambientais e não somente os infecciosos, sendo, por isso, de complexo diagnóstico (WEI *et al.*, 2021). Os sinais clínicos caracterizam-se por desidratação grave, diarreia intensa, desequilíbrio eletrolítico, acidose metabólica, choque hipovolêmico, atraso no ganho de peso e desempenho produtivo (DALL AGNOL *et al.*, 2021).

As doenças entéricas que acometem bovinos levam à redução na produção da indústria leiteira e de corte, deterioram a saúde dos animais, causam morte precoce e causam economicamente muitas perdas para os produtores devido aos custos de tratamento, diagnóstico e perdas de animais (CHO e YOON, 2014). A diarreia neonatal bovina é uma das maiores causas de perdas econômicas na bovinocultura devido à alta morbidade e mortalidade. Fatores sanitários, ambientais, pouca ingestão de colostro e estresse são importantes no desenvolvimento das afecções no sistema digestivo, dessa forma, a identificação dos agentes infecciosos víricos, bacterianos e parasitários tornam o ensaio PCR *Multiplex* um instrumento importante para a detecção rápida, possibilitando o tratamento adequado (YONG, 2010).

Alguns dos agentes infecciosos que causam doença do trato gastrointestinal dos animais são víricos (rotavírus bovino, coronavírus bovino, vírus da diarreia viral bovina), bacterianos (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*) e parasitários (*Cryptosporidium*, *Giardia duodenalis*, *Eimeria*) (DALL AGNOL *et al.*, 2021). Para diagnóstico diferencial, o padrão considerado ouro é a cultura bacteriana, o isolamento em cultivo celular e flotação fecal para visualização de oocistos em microscopia direta (CHO e YOON, 2014). Porém, o resultado dessas técnicas é lento e não acusa coinfeções (GOTO *et al.*, 2020).

Os testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR *Multiplex* são interessantes formas de realizar a diferenciação do agente causador dessas doenças, pois tem alta sensibilidade, especificidade, entregam resultados rapidamente, diminuem custos e permitem a detecção simultânea de agentes etiológicos diferentes em um mesmo momento e utilizando-se uma mesma amostra biológica (FUJIOKA, OTOMO, AHSAN, 2013).

2.2 Afecções do sistema reprodutivo

Doenças que acometem o sistema reprodutivo de bovinos podem causar importantes perdas econômicas na bovinocultura devido à má formação fetal, abortos, infertilidade, teratogênese, reabsorção de embrião, mumificação fetal e natimortos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021). Causam grandes perdas econômicas especialmente na produção em sistemas do tipo confinamento, cujas estratégias de controle são diretamente relacionadas com o manejo sanitário e os protocolos de vacinação, sem a diferenciação dos agentes que causam as enfermidades, não há o correto protocolo sanitário implementado nas propriedades e ocorre uma maior disseminação das doenças (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2016).

A disseminação pode ocorrer de forma rápida e permitir uma ampla disseminação nos rebanhos através de coito, inseminação artificial realizada com sêmen contaminado, contato direto via aerossóis, fômites e/ ou de forma iatrogênica. A apresentação clínica é característica, porém muitos dos animais infectados apresentam a doença de forma subclínica e isso dificulta um

diagnóstico rápido e eficaz. Na maior parte dos casos as técnicas utilizadas para diferenciação etiológica envolvem microscopia óptica, imunofluorescência, isolamento viral em cultivo celular, cultura bacteriana, flotamento fecal e PCRs com alvos individuais (MACLACHLAN, 2011).

As herpesviroses (BoHV-1), a diarreia viral bovina (BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3), a neosporose (*Neospora caninum*) e a leptospirose (*Leptospira spp.*) são enfermidades que comumente acarretam no comprometimento do sistema reprodutivo dos bovinos. Devido ao fato dessas doenças apresentarem sinais clínicos parecidos e serem derivadas de infecções causadas por vírus, bactérias e protozoários, o seu diagnóstico diferencial é realizado de forma dificultada (MACLACHLAN, 2011).

Para permitir o tratamento, prevenção e controle dessas doenças é necessário que seja realizado o diagnóstico diferencial. Atualmente, as técnicas mais utilizadas para esse fim são laboriosas, demoradas, buscam em sua maioria, apenas um alvo, fazendo com que não haja rapidez e nem indicativo de infecções causadas por mais de um agente patogênico nos animais acometidos. A utilização de um PCR *Multiplex* possibilita uma diminuição dos custos, implementação correta de manejo sanitário e protocolos adequados de vacinação (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2016).

2.3 Afecções do sistema respiratório

Em bovinos, as doenças respiratórias são consideradas um grande problema para a produção desses animais, causam imensas perdas econômicas com a diminuição na produtividade nas propriedades onde essas enfermidades estão presentes (THONUR *et al.*, 2012). As afecções do sistema respiratório, em caninos, são causadas por diversos agentes etiológicos diferentes, tais quais, adenovírus tipo 2, vírus da cinomose canina, vírus da influenza canina, vírus da parainfluenza canina, herpesvirus canino, *Bordetella bronchiseptica* e outros (HAO *et al.*, 2019). Na equinocultura, os herpesvírus tipo 1, 4, 2 e 5 estão associados aos sinais clínicos do trato respiratório (WANG *et al.*, 2006).

Apesar da etiologia ser multifatorial (envolvendo questões sobre imunidade, ambiente, densidade de animais, umidade, transporte, clima, estresse, nutrição inadequada, baixa ingestão de colostro, etc.), os agentes infecciosos são cruciais para o desenvolvimento das doenças que acometem o sistema respiratório. Os principais patógenos envolvidos nessas doenças em bovinos são herpesvírus bovino-1, vírus respiratório sincicial bovino, parainfluenza bovina-3 e, muito frequentemente, ocorre a coinfeção com patógenos oportunistas como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somni* e diversas espécies de micoplasma (ELLIS, 2001).

Na indústria aviária, a infecção do trato respiratório causa alta mortalidade, é altamente contagiosa e resulta em grandes perdas econômicas. A etiologia da doença é complexa e muitas vezes envolve mais de um agente patogênico ao mesmo tempo, o que resulta em maiores dificuldades para se alcançar o diagnóstico completo e permitir o correto manejo sanitário, tratamento dos animais doentes e implementação de protocolos de prevenção. Alguns dos agentes etiológicos envolvidos na doença em aves são pneumovírus aviário, vírus da influenza aviária, vírus da doença de Newcastle e bactérias oportunistas (MALIK *et al.*, 2004).

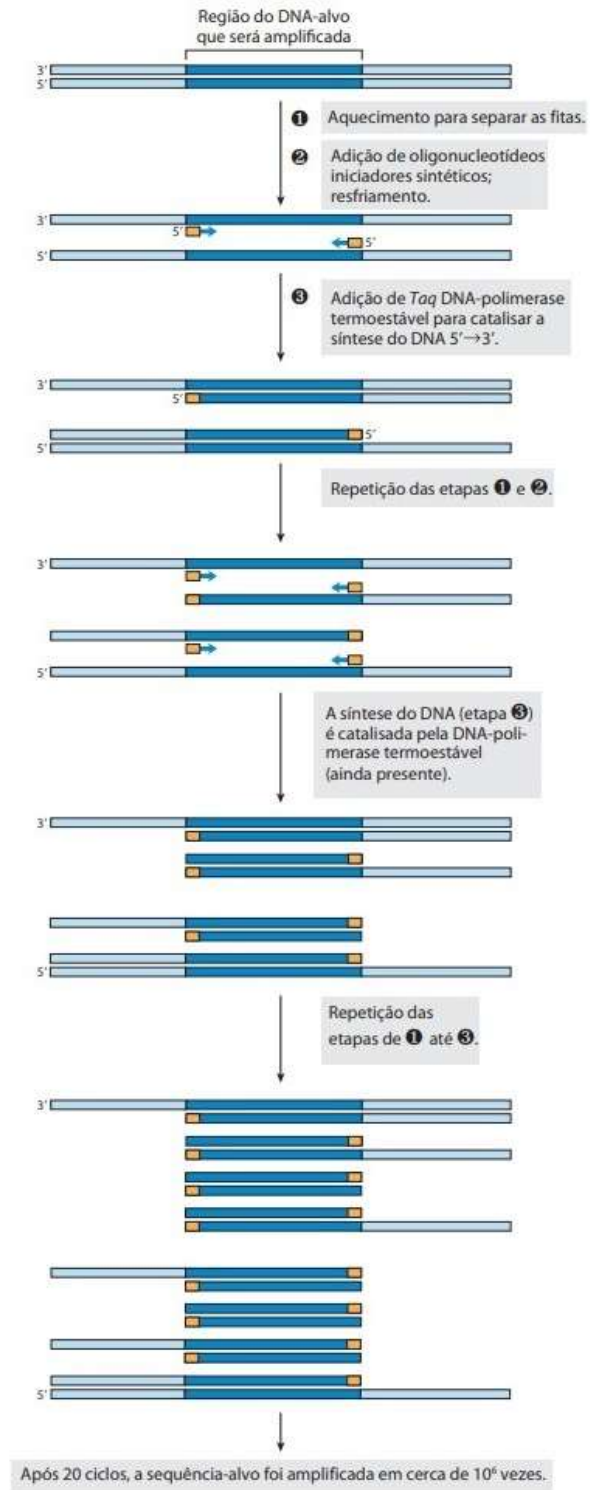
Os métodos diagnósticos empregados para diferenciação etiológica acontecem de forma dispendiosa e demorada devido à grande variedade de agentes patogênicos causadores dessas doenças. Devido à isso, o diagnóstico das enfermidades acometidas no trato respiratório de bovinos, caninos, aves e equinos pode ser muito beneficiado com o desenvolvimento de um ensaio PCR *Multiplex* com múltiplos alvos para cada espécie (GOTO *et al.*, 2020).

3 METODOLOGIA DO PCR *MULTIPLEX*

As cepas víricas, bactérias e parasitas usadas para delineamento de um novo PCR *Multiplex* devem ser epidemiologicamente as mais frequentes em uma determinada região e acometer animais desenvolvendo sinais clínicos semelhantes entre si; desta forma, a técnica permitirá o diagnóstico diferencial e permitirá o tratamento adequado (RACHLIN, 2005).

Um PCR *Multiplex* irá precisar de quatro elementos básicos para a amplificação do DNA alvo: pares de *primers* específicos para alvos estáveis de cada agente etiológico, dNTPs, DNA polimerase e a amostra que será analisada. Em um primeiro momento a mistura (mix) é aquecida de forma rápida para ocorrer a desnaturação do DNA e separar as fitas. Ocorre então o resfriamento que permite a renaturação do material genético iniciado pelos *primers*, e a enzima DNA polimerase utiliza o conjunto de dNTPs para replicar seletivamente o alvo genético. O ciclo de aquecimento e resfriamento é repetido de 25 a 30 vezes em algumas horas dentro de um termociclador. A cada ciclo a quantidade de material genético alvo amplificada é multiplicado por um fator de 2, após 20 ciclos, o DNA alvo foi multiplicado acima de um milhão de vezes e após 30 ciclos, acima de um bilhão de vezes. O restante de material genético na mistura, que não há interesse em identificar, não é amplificado (LEHNINGER, 2014). Na Figura 1, pode ser observado um fluxograma explicativo das etapas que permitem a amplificação de DNA da reação em cadeia da polimerase com alvos únicos.

Figura 1. Fluxograma da reação em cadeia da polimerase.



Fonte: LEHNINGER (2014).

Nas tabelas a seguir, podem ser verificados exemplos de mix para reações de PCR individuais para detecção de cinomose (Tabela 1), parainflueza (Tabela 2) e rotavírus (Tabela 3), utilizados no Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria. Observa-se que, como demonstrado nas tabelas a seguir, é possível fazer a identificação de somente um vírus no PCR convencional.

Tabela 1. Mix para reação de PCR para o vírus da cinomose (CDV).

Q	Identificação	Água (μL)	Tampão (μL)	dNTPs (μL)	Mg (μL)	<i>Primer F</i> (μL)	<i>Primer R</i> (μL)	Taq (μL)	MT (μL)
1	C+	6,3	1	0,2	0,3	0,5	0,5	0,2	1
2	Amostra	6,3	1	0,2	0,3	0,5	0,5	0,2	1
3	C – ext	6,3	1	0,2	0,3	0,5	0,5	0,2	1
4	C – mix	6,3	1	0,2	0,3	0,5	0,5	0,2	1
Total		25,2	4	0,8	1,2	2	2	0,8	4

Fonte: Setor de Virologia UFSM, 2022.

Q: quantidade de microtubos; dNTPs: desoxinucleotídeos trifosfatos; Mg: magnésio; *Primer F*: iniciador senso; *Primer R*: iniciador antisenso; Taq: enzima Taq DNA polimerase ; MT: material genético proveniente da amostra; C+: controle positivo; C – ext: controle negativo da extração; C- mix: controle negativo do mix.

Tabela 2. Mix para reação de PCR para parainfluenzavírus tipo 5 (PIV-5).

Q	Identificação	Água (μL)	Tampão (μL)	dNTPs (μL)	Mg (μL)	<i>Primer F</i> (μL)	<i>Primer R</i> (μL)	Taq (μL)	MT (μL)
1	C+	6,4	1	0,2	0,3	0,5	0,5	0,1	1
2	Amostra	6,4	1	0,2	0,3	0,5	0,5	0,1	1
3	C - ext	6,4	1	0,2	0,3	0,5	0,5	0,1	1
4	C - mix	6,4	1	0,2	0,3	0,5	0,5	0,1	1
Total		25,6	4	0,8	1,2	2	2	0,4	4

Fonte: Setor de Virologia UFSM, 2022.

Q: quantidade de microtubos; dNTPs: desoxinucleotídeos trifosfatos; Mg: magnésio; *Primer F*: iniciador senso; *Primer R*: iniciador antisenso; Taq: enzima Taq DNA polimerase ; MT: material genético proveniente da amostra; C+: controle positivo; C – ext: controle negativo da extração; C- mix: controle negativo do mix.

Tabela 3. Mix para reação de PCR para rotavírus (CRV).

Q	Identificação	Água (μL)	Tampão (μL)	dNTPs (μL)	Mg (μL)	Primer F (μL)	Primer R (μL)	Taq (μL)	MT (μL)
1	C+	6,1	1	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2	1
2	Amostra	6,1	1	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2	1
3	C - ext	6,1	1	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2	1
4	C - mix	6,1	1	0,2	0,5	0,5	0,5	0,2	1
Total		24,4	4	0,8	2	2	2	0,8	4

Fonte: Setor de Virologia UFSM, 2022.

Q: quantidade de microtubos; dNTPs: desoxinucleotídeos trifosfatos; Mg: magnésio; *Primer F*: iniciador senso; *Primer R*: iniciador antisenso; Taq: enzima Taq DNA polimerase ; MT: material genético proveniente da amostra; C+: controle positivo; C – ext: controle negativo da extração; C- mix: controle negativo do mix.

Na Tabela 4, pode ser verificado um exemplo de mix para reação de ensaio de PCR *Multiplex* com alvo para agentes que afetam o sistema gastrointestinal de bovinos, de acordo com projeto desenvolvido no Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria. Neste caso, diferente do que é demonstrado nas tabelas anteriores, vários agentes patogênicos podem ser identificados a partir de uma única reação de PCR.

Tabela 4. Mix para *multiplex* – sistema gastrointestinal de bovinos.

Q	Identificação	Água (μL)	Tampão (μL)	Sal F (μL)	Sal R (μL)	BRV F (μL)	BRV R (μL)	CRY F (μL)	CRY R (μL)	K99 F (μL)	K99 R (μL)	BCV F (μL)	BCV R (μL)	Taq (μL)	MT (μL)	VT (μL)
1	C+1	0,3	7,5	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	1	5	15
2	C+2	0,3	7,5	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	1	5	15
3	C+3	0,3	7,5	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	1	5	15
4	C+4	0,3	7,5	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	1	5	15
5	C+5	0,3	7,5	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	1	5	15
6	Amostra	0,3	7,5	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	1	5	15
7	C – ext	0,3	7,5	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	1	5	15
8	C- mix	0,3	7,5	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	1	5	15
Total		2,4	60	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	8	40	120

Fonte: Setor de Virologia UFSM, 2022.

Q: quantidade de microtubos; Sal F: iniciador senso para *Salmonella enterica*; Sal R: iniciador antisenso para *Salmonella enterica*; BRV F: iniciador senso para rotavírus bovino; BRV R: iniciador antisenso para rotavírus bovino; CRY F: iniciador senso para *Cryptosporidium parvum*; CRY R: iniciador antisenso para *Cryptosporidium parvum*; K99 F: iniciador senso para *Escherichia coli*; K99 R: iniciador antisenso para *Escherichia coli*; BCV F: iniciador senso para coronavírus bovino; BCV R: iniciador antisenso para coronavírus bovino; Taq: enzima Taq DNA polimerase; MT: material genético proveniente da amostra; VT: volume total final; C+ 1: controle positivo para agente etiológico 1; C+ 2: controle positivo para agente etiológico 2; C+ 3: controle positivo para agente etiológico 3; C+ 4: controle positivo para agente etiológico 4; C+ 5: controle positivo para agente etiológico 5; C – ext: controle negativo da extração; C- mix: controle negativo do mix.

Abaixo, pode ser observado um exemplo de protocolo sugerido para amplificação de múltiplos alvos em técnica de PCR *Multiplex*, com a descrição dos ciclos, temperaturas e duração de cada etapa, que podem ser alterados durante o desenvolvimento de um novo mPCR.

Tabela 5. Protocolo de amplificação mPCR – eletroforese em gel de agarose.

Passo	Ciclos	Temperatura	Tempo
Ativação	1	95°C	2 min
Desnaturação		95°C	30 s
Anelamento	30-40	60°C	90 s
Extensão		72°C	60 s/ kb do maior amplicon
Extensão final	1	72°C	10 min
Final	1	4°C	Infinito

Fonte: Thermo Fisher Scientific, 2022.

°C: graus Celsius; min: minutos; s: segundos; s/ kb: segundos por quilobite; *amplicon*: produto da amplificação.

3.1 Cepas víricas, bactérias e parasitas

Dentre os acometimentos no sistema gastrointestinal, os agentes etiológicos rotavírus bovino, coronavírus bovino, vírus da diarreia viral bovina, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium*, *Giardia duodenalis* e *Eimeria*, são alguns dos mais importantes (DALL AGNOL *et al.*, 2021). No sistema reprodutivo, alguns patógenos que podem ser causadores de doenças são as herpesvíroses, a diarreia viral bovina, a neosporose e a leptospirose (MACLACHLAN, 2011). Nos sistemas de produção de aves podemos citar vírus respiratório sincicial bovino, herpesvírus bovino-1, parainfluenza bovina-3, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Haemophilus somni* e micoplasma (ELLIS, 2001).

As cepas víricas, bactérias e parasitas usadas para delineamento de um novo PCR *Multiplex* devem ser epidemiologicamente as mais frequentes em uma determinada região e acometer animais desenvolvendo sinais clínicos semelhantes

entre si, a técnica permitirá o diagnóstico diferencial e permitirá o tratamento adequado (RACHLIN, 2005).

3.2 Primers

Primers são segmentos de ácidos nucleicos que atuam como iniciadores para a replicação de DNA. Para a PCR realizar a amplificação de alvos é necessário a amostra de DNA, *primers* (par de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos), desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) e a enzima DNA-polimerase. As sequências amplificadoras podem ser desenhadas à mão ou com o auxílio de programas específicos para esse fim, como Primer-BLAST, BLAST, FastPCR, Geneious, entre outros. Os *primers* utilizados para cada agente etiológico devem buscar regiões conservadas dos genomas, pois cepas víricas podem sofrer mutações e alterar partes importantes do RNA ou DNA (HAO, 2019). Na literatura, há um grande número de alvos que podem ser usados para o desenho de *primers*, cada alvo apresenta características e podem ter regiões conservadas ou sequências variáveis. Devido à isso, a escolha do alvo para o desenho dos *primers* de cada agente etiológico influencia na especificidade e na sensibilidade da técnica (CONTER *et al.*, 2019). O critério mais importante para o desenho de *primers* em uma reação de PCR para detecção de múltiplos alvos é a similaridade das temperaturas e limites de tempo para garantir o desempenho mais sensível e específico sob as mesmas condições de amplificação (KONG e GILBERT, 2007).

Outro aspecto importante a ser levado em consideração na escolha dos *primers* utilizados para desenvolvimento de um ensaio de PCR *Multiplex* é o tamanho dos produtos amplificados para que seja possível a visualização em eletroforese em gel de agarose (CARLSON *et al.*, 2013). Na Tabela 6 é evidenciada a sequência de nucleotídeos de cada *primer* e o tamanho do produto amplificado para alguns dos vírus que causam doenças respiratórias e entéricas em caninos (HAO *et al.*, 2019).

Tabela 6. *Primers* - doenças respiratórias e entéricas de caninos.

Vírus	Primer	Sequência	Produtos de PCR
CAV-2	CAV-2-F ^a	CGCTGARCAYTACTACCTTGTCTATATTTATG	1020 pb
	CAV-2-R ^b	GGTAGAGCWCTTCGTGTCCGCTT	
CDV	CDV-F	AGATTCAGCCATTTGTAGCCA	794 pb
	CDV-R	GTTGGACTACCTGAGCCCTA	
CIV	CIV-F	CAAGCACTAATCAAGAACAAAC	544 pb
	CIV-R	TCTGCTGCTTGTCTGTACCTT	
CPIV	CPIV-F	ACAAAAATGTCATCCGTGCT	386 pb
	CPIV-R	ATCTCTCCACGGCTCATACC	
CanineCV	CanineCV-F	GCGTTTACCTGTTACACC	819 pb
	CanineCV-R	AACTGTTTCATCTGCGRCTG	
CCoV	CCoV-F	AGGAAGGCAACAATCCAATA	477 pb
	CCoV-R	GCCACCTCTGATGGACGA	
CPV	CPV-F	AAGACGTGCAAGCGAGTCC	337 pb
	CPV-R	GAGCGAAGATAAGCAGCGTAA	

Fonte: Hao *et al.*, 2019.

Primer: sequência iniciadora; PCR: reação em cadeia da polimerase; CAV-2: adenovírus canino tipo 2; CAV-2-F^a: iniciador senso para adenovírus canino tipo 2; CAV-2-R^b: iniciador antisenso para adenovírus canino tipo 2; CDV: vírus da cinomose canina; CDV-F: iniciador senso para vírus da cinomose canina; CDV-R: iniciador antisenso para vírus da cinomose canina; CIV: vírus da gripe canina; CIV-F: iniciador senso para vírus da gripe canina; CIV-R: iniciador antisenso para vírus da gripe canina; CPIV: vírus da parainfluenza canina; CPIV-F: iniciador senso para vírus da parainfluenza canina; CPIV-R: iniciador antisenso para vírus da parainfluenza canina; CanineCV: circovírus canino; CanineCV-F: iniciador senso para circovírus canino; CanineCV-R: iniciador antisenso para circovírus canino; CCoV: coronavírus canino; CCoV-F: iniciador senso para coronavírus canino; CCoV-R: iniciador antisenso para coronavírus canino; CPV: parvovírus canino; CPV-F: iniciador senso para parvovírus canino; CPV-R: iniciador antisenso para parvovírus canino; pb: pares de bases.

3.3 Amostras clínicas para uso em PCR Multiplex

As amostras clínicas utilizadas para a realização da técnica de PCR *Multiplex* poderão ser provenientes de amostras de tecidos (pele, fígado, cérebro, intestino, entre outros), sangue, fezes, líquido, leite, placenta, fetos abortados, etc. A escolha deverá ser realizada com a suspeita do agente etiológico e seu sítio de predileção nos organismos (MAKINO *et al.*, 1999).

3.4 Extração de ácidos nucleicos

A extração de DNA por Trizol pode ser realizada utilizando-se soluções, monocamadas celulares diluídas, sangue, suabes e amostras de tecido. A proporção utilizada para ressuspensão deve ser de 100-150 mg de amostra para 900 µL de Trizol e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Após os minutos necessários para a primeira incubação, 120 µL de clorofórmio devem ser adicionados à mistura e agita-se vigorosamente. Faz-se uma incubação por mais 3 minutos em temperatura ambiente. Os tubos devem ser centrifugados por 15 min a 14.000 rpm a 4°C. A fase aquosa translúcida superior deve ser coletada, assim como a fase intermediária e a amostra é transferida para outro tubo livre de Rnase e DNase. Deves er adicionado 375 µL de álcool isopropílico e nova incubação feita por 10 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, centrifuga-se por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C para permitir a formação de pellets e remoção do sobrenadante. Para lavar o pellet, adiciona-se 375 µl de etanol 75%, com posterior centrifugação a 9500 rpm por 5 minutos. O etanol adicionado deve ser removido por inversão e uma nova centrifugação deve ser realizada por no máximo 1 minuto na velocidade máxima, a última gota deve ser retirada com auxílio de uma pipeta. A secagem deve ser feita em temperatura ambiente por 5 minutos e o pellet deve ser dissolvido em 40 µl de Tris-EDTA (TE) pré-aquecido. Os tubos contendo DNA podem ser armazenados em freezer a -20°C ou -80°C.

Pode ser realizada a extração de RNA por Trizol a partir de soluções, monocamadas celulares diluídas, sangue, suabes e amostras de tecidos. Primeiramente, macera-se com o auxílio de bisturi, de 100 -150 mg de amostra e esse material deve ser ressuspendido com o auxílio de pipeta em 900 uL de Trizol. Posteriormente, incuba-se por 5 minutos em temperatura ambiente. Passado o tempo necessário, acrescenta-se 200 uL de clorofórmio e agita-se vigorosamente. Novamente deve ser realizada uma incubação em temperatura ambiente, por 3 minutos. Centrifuga-se por 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C, será formada retira-se a fase superior translúcida e transfere-se para um tubo livre de RNase e DNase, acrescenta-se 500 uL de álcool isopropílico e incuba-se por 10 minutos em temperatura ambiente. Novamente, os tubos devem ser centrifugados a 14.000 rpm a 4°C por 10 minutos para que seja possível a formação de pellet e retirada do sobrenadante. Adiciona-se 500 uL de etanol 75% para lavagem do pellet e posterior centrifugação a 9500 rpm por 5 minutos. Remove-se o etanol por inversão e faz-se

uma centrifugação rápida por 1 minuto na rotação máxima, a última gota deve ser retirada com pipeta. Os tubos devem secar à temperatura ambiente por 5 minutos e depois, deve-se dissolver o pellet em 40 uL de Tris-EDTA (TE) pré-aquecido. O armazenamento pode ser realizado em freezer a -20°C ou -80°C.

3.5 Isolamento e identificação dos agentes etiológicos

O isolamento e identificação dos agentes etiológicos podem ser feitos através de isolamento em cultivo celular, isolamento bacteriano ou isolamento de protozoários. Para que os microorganismos possam ser isolados e identificados deve ser levado em consideração as características do ambiente ou organismo em que ele vive ou se prolifera, a técnica adequada para cada agente etiológico, o tipo de cultura a ser utilizado, as condições físicas ambientais necessárias ao crescimento/ aumento de quantidade, pH, passagens celulares, repiques bacterianos e a forma que será empregada para estocagem desses patógenos (LAMAM, 2018).

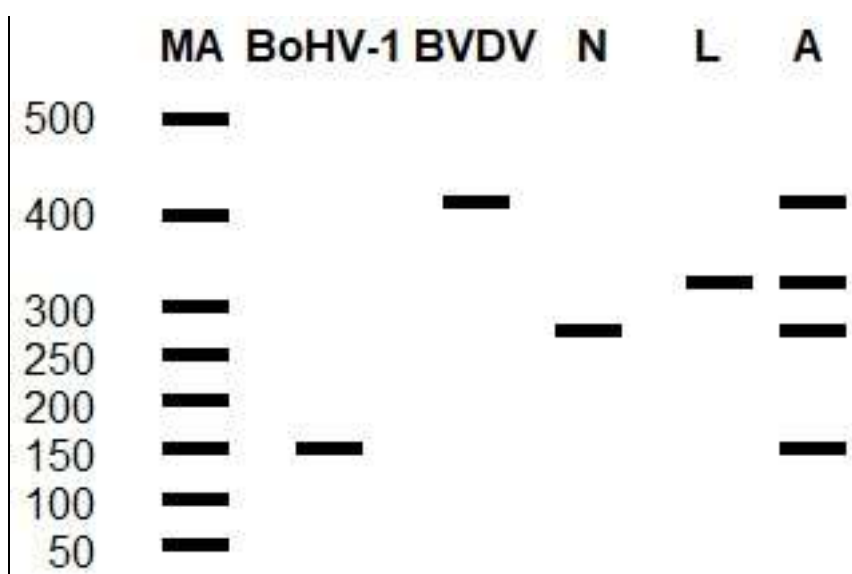
3.6 Padronização e otimização das reações individuais vs. *Multiplex*

As amostras isoladas e identificadas podem ser usadas como controles positivos para a padronização das reações individuais. Cada agente patogênico possui características diferentes e isso faz com que haja diferenças nas temperaturas de anelamento, tempo de extensão para amplificação dos alvos e nas quantidades ótimas de ciclos para a reação individual de PCR. Os kits comerciais individuais sugerem essas características e alcançam resultados satisfatórios de quantidade de DNA amplificado, mas para o de PCR *Multiplex* com novos alvos e novas combinações devem ser realizadas várias tentativas com suposições aproximadas de temperatura e tempo. Algumas das condições ideais para amplificação genômica são encontradas na literatura e podem ser utilizadas como ponto de partida para a reação do ensaio com múltiplos alvos (CARLSON *et al.*, 2013).

3.7 Sensibilidade e especificidade analítica e diagnóstica

Após ser realizada a padronização e otimização da reação de PCR *Multiplex*, deve ser realizada a sensibilidade de detecção dos agentes etiológicos no ensaio múltiplo em comparação à sensibilidade dos ensaios individuais. A sensibilidade e especificidade diagnóstica são relativas à amplificação de amostras positivas e a não amplificação de amostras não positivas. A sensibilidade analítica é relativa ao limite de detecção (*tissue culture infection dose* – TCID₅₀) e também deverá comparar as reações individuais com as do ensaio *multiplex*. A especificidade analítica é testada através da inclusão de controles positivos para doenças com sinais clínicos semelhantes, porém, com agentes etiológicos diferentes, é relativo ao resultado positivo apenas para os agentes alvo. A reação de PCR *Multiplex* ideal deve permitir a identificação dos diferentes alvos conforme figura 3 (KONG e GILBERT, 2006).

Figura 2. Esquemática de eletroforese em gel de agarose mPCR.



Fonte: Guerra, 2022.

MA: marcador de 50 pb; BoHV-1: Herpesvírus bovino tipo – 1; BVDV: Vírus da diarreia viral bovina; N: *Neospora caninum*; L: *Leptospira spp.*; A: amostra positiva para os quatro agentes etiológicos.

3.8 Validação de um ensaio de PCR *Multiplex*

Para validação de um ensaio de PCR *Multiplex* é necessária a leitura em gel de agarose, onde deve ser pipetado o marcador que permite analisar o tamanho dos produtos amplificados, controle positivo e negativo previamente conhecidos, e as amostras que serão analisadas. Os controles positivos e negativos podem ser provenientes de amostras selecionadas do laboratório, ou de *kits* comerciais. Em

seguida, deve ser realizada a purificação dos produtos e sequenciamento genético. A purificação dos produtos em gel de agarose pode ser realizada com *kits* comerciais e esta etapa é necessária para remover contaminantes, como enzimas, dNTPs não associados à amplificação e *primers*. A técnica mPCR deve ser repetida por outra pessoa responsável e alcançar parâmetros bons de reprodutibilidade, repetibilidade, sensibilidade, especificidade e acurácia (SOUTO, 2020). O grau de acurácia é obtido com a relação à resposta de controles positivos e as amostras analisadas pelo ensaio desenvolvido, a sensibilidade é referente à mPCR detectar o ácido nucleico específico quando o controle é positivo, e a especificidade é referente à não detecção do ácido nucleico específico quando usado um controle negativo (BRASIL, 2015).

4 POSSÍVEIS RESTRIÇÕES E SOLUÇÕES

O ensaio de PCR *Multiplex* exige o uso de diferentes *primers* para cada doença a ser analisada e o acréscimo desses oligonucleotídeos aumenta a probabilidade de ocorrer amplificações inespecíficas durante os ciclos no termociclador. Outro aspecto importante que deve ser considerado é a sensibilidade analítica diminuída em comparação às reações feitas de forma individual. Durante o processo de otimização e padronização dos tempos e temperaturas, pode ser acrescentado etapas extras para permitir a amplificação dos diferentes alvos que estão sendo analisadas. Assim, é favorecida a formação de dímeros que dificultam a visualização da eletroforese de PCR em gel de agarose. Para diminuir a ocorrência desses problemas, deve ser otimizada a reação e, pode-se também, haver a troca de *primers* sintéticos por outros que causem menos formação de bandas inespecíficas (CHAMBERLAIN, 1994).

5 CONCLUSÃO

A técnica de PCR *Multiplex* é uma variação do PCR convencional na qual dois ou mais alvos são amplificados de forma simultânea em uma mesma reação e permite o diagnóstico diferencial de agentes patogênicos ou coinfeções nos animais acometidos. Este tipo de ensaio pode ajudar em diversas áreas de estudos que envolvem o genoma de microorganismos, tais quais, deleção de genes, mutações, polimorfismos ou ensaios quantitativos (Henegariu, 1997).

Existem diversas doenças que apresentam sinais clínicos semelhantes entre si dentre os animais de produção, silvestres e de companhia, causam perdas econômicas consideráveis e podem levar à problemas com uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos. Os métodos tradicionais de diagnóstico como isolamento em cultivo celular, hemaglutinação, ELISA, imunofluorescência e cultivo bacteriano podem demorar vários dias, necessitam do envolvimento de pessoal com conhecimento técnico específico e nem sempre são tão sensíveis. As novas tecnologias envolvendo a biologia molecular surgiram pra suprir a demanda clínica para o rápido diagnóstico diferencial de muitas afecções na medicina veterinária, apresentam resultados rápidos e têm alta sensibilidade (HUANG *et al.*, 2018).

O diagnóstico realizado nos estágios iniciais das doenças permite adaptações no manejo sanitário, tratamento e possibilita uma menor distribuição dessas infecções para outros animais, melhorando o bem estar animal e beneficiando economicamente os produtores (SCARCELLI *et al.*, 2003). O PCR *Multiplex* é uma técnica molecular sensível, pode ser adaptada para muitas combinações de agentes etiológicos mais prevalentes em determinadas regiões e é altamente eficaz para acusar baixos níveis de material genético nas amostras (SAFARPOOR, 2011).

A técnica de mPCR também pode beneficiar a importação e exportação de produtos animais, detectando a contaminação e impedindo assim, que haja a disseminação descontrolada de patógenos exóticos. A indústria leiteira, o sêmen criopreservado para fins de inseminação artificial, subprodutos de aviários, entre outros, também são beneficiados com a rápida análise e resultados de agentes

etiológicos frequentes (SOUZA et al., 2018).

Atualmente, há uma grande preocupação com o aumento dos níveis mundiais de resistência à antimicrobianos derivada da prescrição feita inescrupulosamente e do uso indiscriminado desses medicamentos. Os ensaios de PCR *Multiplex* permitem informações rápidas referentes aos alvos analisados e possibilitam um correto tratamento dos animais acometidos, diminuindo o surgimento de microorganismos resistentes aos medicamentos utilizados na veterinária (RADER et al., 2021).

REFERÊNCIAS

BASZLER, Timothy V. et al. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 12, p. 4059-4064, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. **Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários**. Brasília: MAPA/ACS, 2015. 57 p

CARLSON, Christopher S. et al. Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2013.

Chamberlain, J.S., Chamberlain, J.R. (1994). Optimization of Multiplex PCRs. In: Mullis, K.B., Ferré, F., Gibbs, R.A. (eds) **The Polymerase Chain Reaction**. Birkhäuser, Boston, MA.

Chang L, Hsiao C, Chen, *et al* Accuracy and comparison of two rapid multiplex PCR tests for gastroenteritis pathogens: a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open Gastroenterology** 2021;8:e000553.

CHO, Y. IL; YOON, K. J. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. **Journal of Veterinary Science**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 2014.

Conter, C.C., Mota, C.A., dos Santos, B.A., de Souza Braga, Laí., de Souza Terron, M., Navasconi, Taí.Rocha., Fernandes, A.C.B.S., Demarchi, I.G., de Castro, Ká.Rosi.Reinhold., Aristides, S.M.A., Lonardoni, M.V.C., Teixeira, J.J.V., Silveira, Thaí.Gomes.Verzignassi., PCR primers designed for new world *Leishmania*: A systematic review, **Experimental Parasitology** (2019).

DALL AGNOL, A. M. Et al. Severe outbreak of bovine neonatal diarrhea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2021.

De Oliveira PSB, Silva Júnior JVJ, Weiblen R, Flores EF. Subtyping bovine viral diarrhea virus (BVDV): Which viral gene to choose? **Infect Genet Evol.** 2021 Aug;92:104891.

Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. **PCR Methods Appl.** 1994 Feb;3(4):S65-75.

Ellis JA: The immunology of the bovine respiratory disease complex. **Vet Clin North Am Food Anim Pract** 2001, 17: 535-537

Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clin Microbiol Rev.** 2000 Oct;13(4):559-70.

Fujioka M, Otomo Y, Ahsan CR. A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. **J Microbiol Methods.** 2013 Mar;92(3):289-92.

GOTO, Y. et al. Design of a multiplex quantitative reverse transcription-PCR system to simultaneously detect 16 pathogens associated with bovine respiratory and enteric diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 4, p. 832–847, 2020.

Hao X, Liu R, He Y, Xiao X, Xiao W, Zheng Q, et al. (2019) Multiplex PCR methods for detection of several viruses associated with canine respiratory and enteric diseases. **PLoS ONE** 14(3): e0213295.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques.** 1997 Sep;23(3):504-11.

HUANG, H.-S. et al. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 10, p. 1055-1063, 2018.

Kong, F., Gilbert, G. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)—a practical epidemiological and diagnostic tool. **Nat Protoc** 1, 2668–2680 (2006).

Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular. **ISOLAMENTO E CULTIVO DE MICRORGANISMOS**: algumas regras gerais para a aplicação de abordagens ecológicas para o isolamento de microrganismos. São Carlos: Ufscar, 2018. 10 p.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.. **Princípios de bioquímica**. Tradução de W.R. Loodi, e A.A. Simões. São Paulo: Sarvier, 2014. 1250 p. Tradução de: Principles of biochemistry.

Maclachlan, N. James; Dubovi, Edward J. **Fenner's Veterinary Virology**. 4. Ed. Oxford: Elsevier, 2011. 491 p.

Makino S, Kurazono H, Chongsanguam M, Hayashi H, Cheun H, Suzuki S, Shirahata T. Establishment of the PCR system specific to Salmonella spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. **J Vet Med Sci**. 1999.

MALIK, Yashpal S.; PATNAYAK, Devi P.; GOYAL, Sagar M. Detection of three avian respiratory viruses by single-tube multiplex reverse transcription–polymerase chain reaction assay. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 16, n. 3, p. 244-248, 2004.

Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **J Clin Lab Anal**. 2002;16(1):47-51.

Megid, Jane; Ribeiro, Márcio Garcia; Paes, Antonio Carlos. **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. 1294 p.

RACHLIN, John et al. MuPlex: multi-objective multiplex PCR assay design. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl_2, p. W544-W547, 2005.

RADER, Theodore S.; STEVENS, Michael P.; BEARMAN, Gonzalo. Syndromic Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR) Testing and Antimicrobial Stewardship: Current Practice and Future Directions. **Current Infectious Disease Reports**, v. 23, n. 4, p. 1-8, 2021.

Ruano G, Fenton W, Kidd KK. Biphasic amplification of very dilute DNA samples via 'booster' PCR. **Nucleic Acids Res**. 1989 Jul 11;17(13):5407.

SCARCELLI, Eliana; PIATTI, Rosa Maria; FEDULLO, José Daniel Luzes; SIMON, Faiçal; CARDOSO, Maristela Vasconcellos; CASTRO, Vanessa; MIYASHIRO, Simone; GENOVEZ, Margareth Élide. *Leptospira* spp detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) in clinical samples of captive black-capped Capuchin monkey (*Cebus apella*). **Brazilian Journal Of Microbiology**. São Paulo, 06, 2003.

Safarpour Dehkordi F. Prevalence study of Bovine viral diarrhoea virus by evaluation of antigen capture ELISA and RT-PCR assay in Bovine, Ovine, Caprine, Buffalo and Camel aborted fetuses in Iran. **AMB Express**. 2011 Oct 21;1(1):32.

SOUTO, Lizandra Caroline dos Santos. **Validação de RT-PCR multiplex para detecção de rotavírus A, D, F e G em aves**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Virologia) - Instituto Evandro Chagas, Programa de Pós-Graduação em Virologia, Ananindeua, 2020.

Souza, W. J; Nascente, E. P; Santos, F. C; Malaquias, J. V; Sereno, J. B; Viana, E. F; Silva, C. G; Martins, C. F. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** (Online) ; 70(4): 1163-1171, jul.-ago. 2018.

Thermo Fisher Scientific. **Polymerase Chain Reaction**: pcr enzymes & master mixes. PCR Enzymes & Master Mixes.12, 2022.

Thonur L, Maley M, Gilray J, Crook T, Laming E, Turnbull D, Nath M, Willoughby K. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. **BMC Vet Res**. 2012 Mar 28;8:37.

WANG, L. et al. Detection of respiratory herpesviruses in foals and adult horses determined by nested multiplex PCR. **Veterinary microbiology**, v. 121, n. 1-2, p. 18-28, 2007.

WEI, X. et al. Detection of Infectious Agents Causing Neonatal Calf Diarrhoea on Two Large Dairy Farms in Yangxin County, Shandong Province, China. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. February, p. 1–7, 2021.