

# Desenvolvimento de uma técnica para identificação de *Escherichia coli* patogênicas das aves (APEC) por PCR em tempo Real



Silva, D.W.<sup>1</sup>; Ikuta, N.<sup>2</sup>

1 – Acadêmico de Medicina Veterinária Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS–Brasil.

2 – Professor da Universidade Luterana do Brasil RS–Brasil.

## INTRODUÇÃO

A colibacilose é uma enfermidade relacionada com grandes perdas econômicas na avicultura e é causada pela *Escherichia coli* extraintestinal denominada genericamente como APEC (*Avian Pathogenic Escherichia coli*). O diagnóstico baseado no isolamento bacteriano possui a limitação de evidenciar resultados falsos positivos em decorrência da presença de cepas comensais presentes normalmente no intestino das aves (*Avian Fecal E. coli* - AFEC). Assim, o diagnóstico confirmatório é baseado na detecção de fatores de virulência (FVs) capazes de diferenciar os patótipos APECs de AFECs. A técnica mais aceita atualmente, realiza a detecção de cinco FVs (*iroN*, *iss*, *iutA*, *hlyF*, *ompT*) pela técnica de PCR convencional, onde APECs apresentam um mínimo de quatro dos cinco destes FVs. O objetivo do presente trabalho é desenvolver uma técnica molecular mais rápida, menos subjetiva e menos laboriosa baseada em PCR em tempo real.

## MATERIAL E MÉTODOS

Preparação de primers e sondas para os mesmos alvos da PCR Convencional.



APECs sabidamente positivos para os 5 alvos foram testados individualmente.



Testados na forma de 2 PCR multiplex (*iss* e *iutA*; *hlyF* e *ompT*)



Uma amplificação única de *iroN*

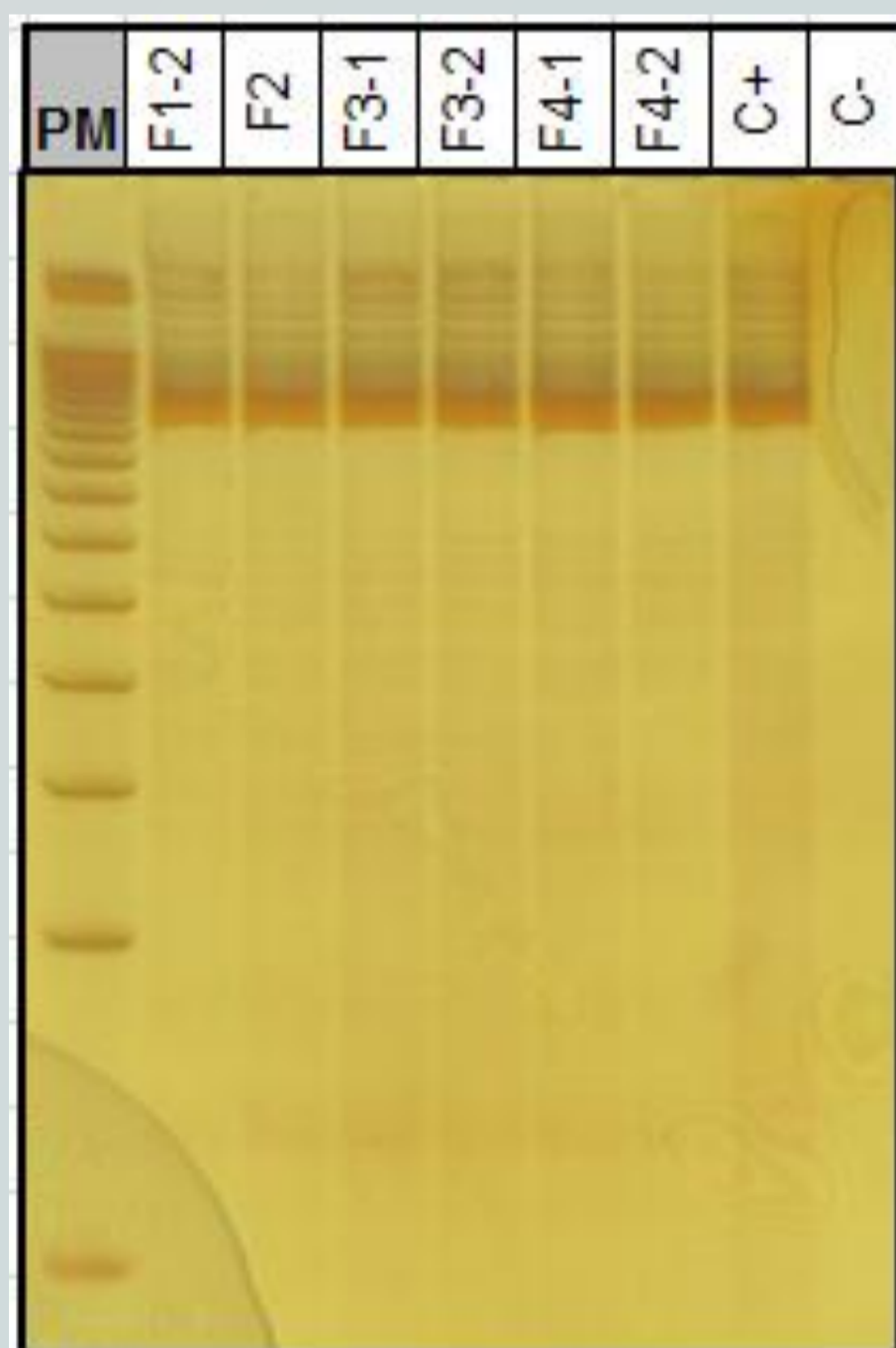


Figura 1. Detecção por gel de poliacrilamida para o alvo *ompT* (496 bp).

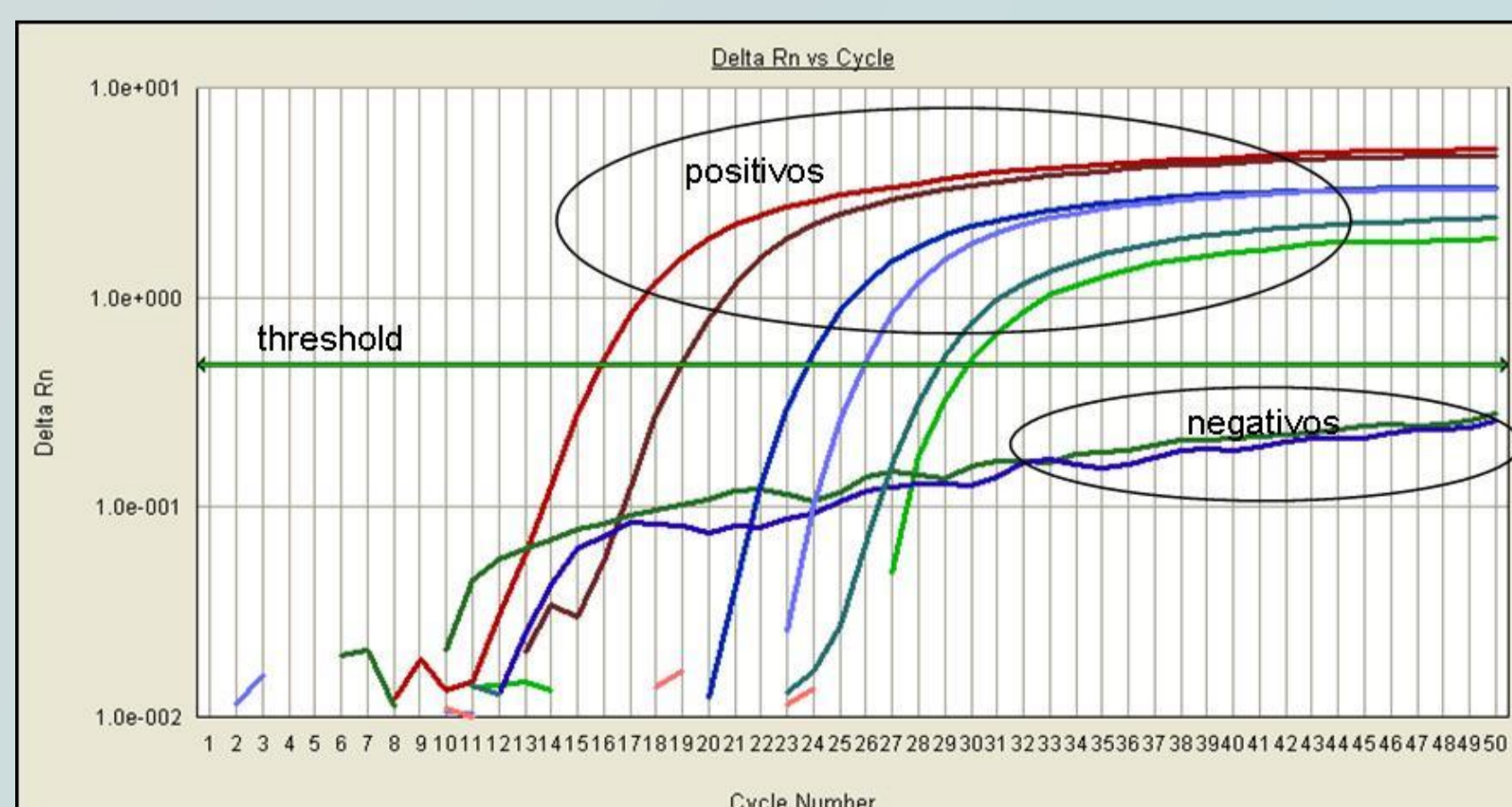


Figura 2. Análise por PCR em tempo real. Curvas representativas de amostras positivas para o alvo *ompT*.

## RESULTADOS

As amostras foram previamente amplificadas por PCR convencional e a detecção realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (figura 1). Posteriormente os 5 alvos foram eficientemente detectados individualmente por ensaios de PCR em tempo real (figura 2), porém constatou-se perda de sensibilidade analítica nos ensaios de duplex PCR para detecção de *iss* e *iutA*. Assim, novos primers e sondas foram selecionadas para detecção destes alvos. Para os 3 alvos restantes (*iroN* e o duplex *hlyF* e *ompT*) deu-se prosseguimento ao projeto realizando um ensaio de casuística, comparando-se resultados obtidos por PCR convencional x PCR em tempo real. Foram analisados até o momento 114 isolados de campo (61 APECs e 53 AFECs), e houve total coincidência de resultados na caracterização dos 61 isolados APEC. Nos 53 AFECs testados, houve somente um isolado com resultado discordante, onde a PCR convencional detectou mais alvos que PCR em tempo real (tabela 1). Quando confrontados os resultados de PCR convencional x PCR em tempo real (*iroN* e duplex *hlyF* e *ompT*), observou-se que as amostras de APEC apresentaram 100% de especificidade, sensibilidade e concordância, enquanto que os isolados de AFEC apresentaram sensibilidade de 92,3% (duplex) e 66,7% (*iroN*), especificidade de 100% e concordância de 98,1% para todos os alvos (tabela 2).

Tabela 1. Tabela comparativa de resultados obtidos na PCR Nolan (Convencional) x qPCR(Real Time).

		Teste de referência Nolan								
		<i>ompT</i>			<i>hlyF</i>			<i>iroN</i>		
		positivo	negativo	total	positivo	negativo	total	positivo	negativo	total
qPCR GLOBAL	positivo	73	0	73	73	0	73	62	0	62
	negativo	1	40	41	1	40	41	1	51	52
	total	74	40	114	74	40	114	63	51	114
qPCR APEC	positivo	61	0	61	61	0	61	60	0	60
	negativo	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	total	61	0	61	61	0	61	60	1	61
qPCR AFEC	positivo	12	0	12	12	0	12	2	0	2
	negativo	1	40	41	1	40	41	1	50	51
	total	13	40	53	13	40	53	3	50	53

Tabela 2. Tabela demonstrativa de sensibilidade, especificidade e concordância para alvos *ompT*, *hlyF* e *iroN* em amostras de APEC e AFEC.

		<i>ompT</i>	<i>hlyF</i>	<i>iroN</i>
GLOBAL	SENSIBILIDADE	98,6	98,6	98,4
	ESPECIFICIDADE	100,0	100,0	100,0
	CONCORDÂNCIA	99,1	99,1	99,1
APEC	SENSIBILIDADE	100,0	100,0	100,0
	ESPECIFICIDADE	100,0	100,0	100,0
	CONCORDÂNCIA	100,0	100,0	100,0
AFEC	SENSIBILIDADE	92,3	92,3	66,7
	ESPECIFICIDADE	100,0	100,0	100,0
	CONCORDÂNCIA	98,1	98,1	98,1

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Até o momento, os primers e sondas que foram desenvolvidos nesse estudo (*hlyF*, *ompT* e *iroN*) mostraram-se promissores na diferenciação de APECs de AFECs. Para conclusão deste trabalho, espera-se testar os novos alvos *iutA* e *iss*, além de aumentar o ensaio de casuística.