

Desenvolvimento de PCR em Tempo Real para detecção de isolados de *Escherichia coli* associados à colibacilose aviária

Silveira, V. P. ^{1,3} ; Ikuta, N. ^{2,3}

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária ULBRA ² Docente ULBRA

³ Laboratório de Diagnóstico Molecular, ULBRA

INTRODUÇÃO

A bactéria *Escherichia coli* é o agente etiológico da colibacilose, doença relacionada com grandes prejuízos na avicultura. O diagnóstico laboratorial da doença se baseia no isolamento de bactérias patogênicas (denominadas APEC, *avian pathogenic E. coli*) a partir de amostras de órgãos e tecidos de aves com sinais clínicos de colibacilose. No entanto, este procedimento é dificultado devido à presença de cepas não patogênicas desta mesma espécie na microflora do trato intestinal normal das aves (denominadas AFEC, *avian fecal E. coli*). Com a utilização das técnicas de biologia molecular é possível detectar genes associados à patogenicidade, possibilitando a identificação de isolados de APEC. Trabalhos anteriores estabeleceram o diagnóstico com a detecção de cinco genes específicos (*ompT*, *hlyF*, *iroN*, *iutA* e *iss*) pela reação em cadeia da polimerase com análise do resultado por eletroforese em gel (PCR convencional).

OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo desenvolver um teste para tipificação de APEC por PCR em tempo real e comparar com o teste de referência PCR convencional, analisando os mesmos 5 fatores de virulência

MATERIAIS E MÉTODOS

- Otimização das 5 reações de PCR em tempo real utilizando os primers e sondas descritos na tabela 1;
- Análise comparativa de resultados com PCR convencional (teste de referência) a partir de um painel de 111 isolados de *E. coli*, obtidos a partir de amostras (órgãos) coletadas de aves de produção industrial (galinhas e perus) com suspeita de colibacilose.

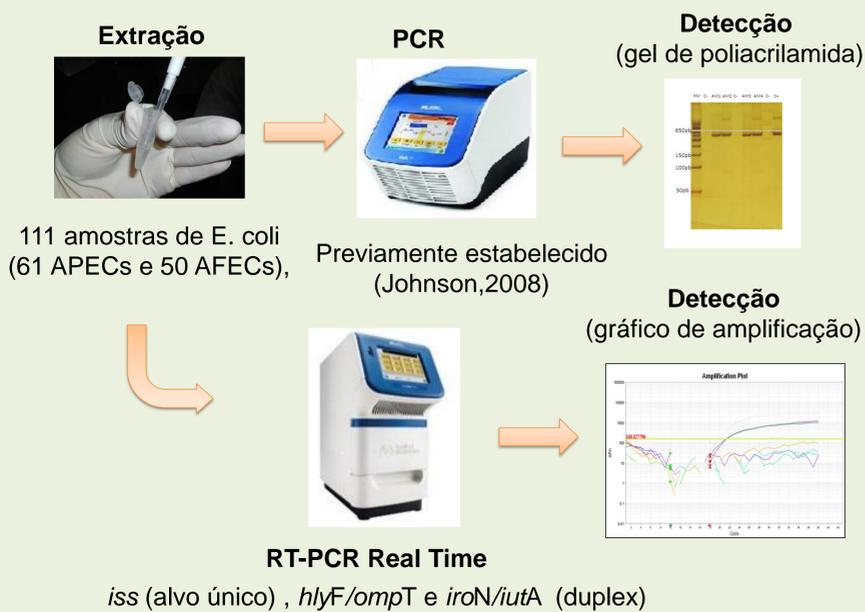


Tabela 1. Sequência dos iniciadores da amplificação por PCR em tempo real

Name	Sequência de oligonucleotídeos (50–30) ^a	Tamanho do produto (pb)
<i>iss</i>	F-TTTCTGCACCGCCACAAA R-CGGGAATTGGACAAGAGAAAAC VIC-TTTGGCTGCATCAAC-NFQ	57
<i>iutA</i>	F-CGGTGGCGTACGCTATCAGT R-GCGCGTAGCCGATGAAAT FAM-CACTGAAAACAAGATTGAT-MGB	59
<i>hlyF</i>	F-GGTTGCCCGACCATCAATT R-ACTGGTTGAAGGTAAGCACCTAA FAM-TTGTTGGCCACAGTCG-MGB	61
<i>ompT</i>	F-GGTTCCGGGATTGCTCGTAT R-GGTCGTGGAGGCAATATGGT VIC-CAGCCAGTCCCTGTC-NFQ	57
<i>iroN</i>	F-CCGTTGGTGACAGAGTGAA R-CAGGCTGGTAGAGGAAGGATCA FAM-CGCGATAAGCTCG-MGB	53

RESULTADOS

Os resultados demonstraram que os cinco genes foram detectados com sucesso pela PCR em tempo real.

Na análise dos 111 isolados verificou-se concordância completa na detecção pelos dois métodos. Foram identificados 61 (55%) isolados como APEC e 50 (45%) como AFEC.

Tabela 2 : Frequência de genes de virulência dos 111 isolados de *E. coli*.

	Total (n=111) n(%)	APEC (n=61) n(%)	AFEC (n=50) n(%)
<i>ompT</i>	71(64,0)	61(100,0)	10(20,0)
<i>hlyF</i>	71(64,0)	61(100,0)	10(20,0)
<i>iroN</i>	60(54,1)	60(98,4)	0(0,0)
<i>iss</i>	59(53,2)	59(96,7)	0(0,0)
<i>iutA</i>	53(47,7)	47(77,0)	6(12,0)

CONCLUSÃO

A PCR em tempo real apresenta o mesmo desempenho analítico da PCR convencional para a diferenciação de APEC e AFEC.

O teste de PCR em tempo real pode ser utilizado na identificação de APEC, com a vantagem de ser mais rápido e prático do que a PCR convencional.

REFERÊNCIAS

- JOHNSON, T.J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S.J.; ROSENBERGER, S.C.; NOLAN, L.K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J. Clin Microbiol.*, v.46, n.12, p.3987-3996, 2008.
- RODRIGUEZ-SIEK, K.E.; GIDDINGS, C.W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T.J.; NOLAN, L. K. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res.*, v.36, n.2, p.241-256, 2005.
- NAKAZATO, G.; CAMPOS, T.A.; STEHLING, E.G.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W.D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesq Vet Bras.*, v.29, n.7, p.479-486, 2009.