

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 multiplex 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. Para tanto, foram preparados *primers* e sondas para os mesmos alvos da PCR convencional. Primeiramente APECs sabidamente positivos para os 5 alvos foram testados individualmente, e posteriormente testados na forma de 2 PCR multiplex (*iss* e *iutA*; *hlyF* e *ompT*) e uma amplificação única (*iroN*). Todos os 5 alvos foram eficientemente detectados individualmente, porém constatou-se perda de sensibilidade analítica nos ensaios em 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 93 isolados de campo (43 APECs e 50 AFECs), e houve total coincidência de resultados na caracterização dos isolados APEC. Nos 50 AFECs testados, houve somente um isolado com resultado discordante, onde a PCR convencional detectou mais alvos que PCR em tempo real. 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.