

Eficiência da PCR em tempo real na caracterização de *Escherichia coli* comensais e patogênicas de aves

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



UFRGS
PROPEAQ

XXV SIC
Salão Iniciação Científica

CA - Ciências Agrárias

INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é um microrganismo comensal presente na microbiota entérica de aves e outros animais. As cepas comensais estão presentes em altas concentrações no intestino das aves e são denominadas genericamente como AFECs (*Avian Fecal Escherichia coli*). Cepas patogênicas (APECs - *Avian Pathogenic Escherichia coli*) relacionadas com a colibacilose, possuem um arsenal de fatores de virulência (FVs) e propiciam infecções extraintestinais. Vários estudos já demonstraram que os genes destes FVs estão concentrados em plasmídeos como o pTJ100, que podem ser eficientemente transmitidos para outras cepas por conjugação, transmitindo a capacidade de causar a colibacilose. Esta enfermidade causa grandes perdas econômicas na avicultura industrial, sendo responsável por aumento nas taxas de mortalidade, redução da conversão alimentar, custos com medicamentos, aumento nas condenações nos abatedouros, etc. O diagnóstico baseia-se no isolamento bacteriano e sua tipificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica visa inferir a presença do plasmídeo que carrega os vários FVs. Assim os trabalhos originais procuraram definir FVs de alta frequência nestes plasmídeos e com baixa frequência nos genomas de AFECs. A técnica mais utilizada internacionalmente analisa a presença de *iroN*, *iss*, *iutA*, *hlyF* e *ompT*, e uma *Escherichia coli* é classificada como APEC quando são detectados 4 ou 5 destes FVs, e como AFEC quando se detecta entre 0 a 3.

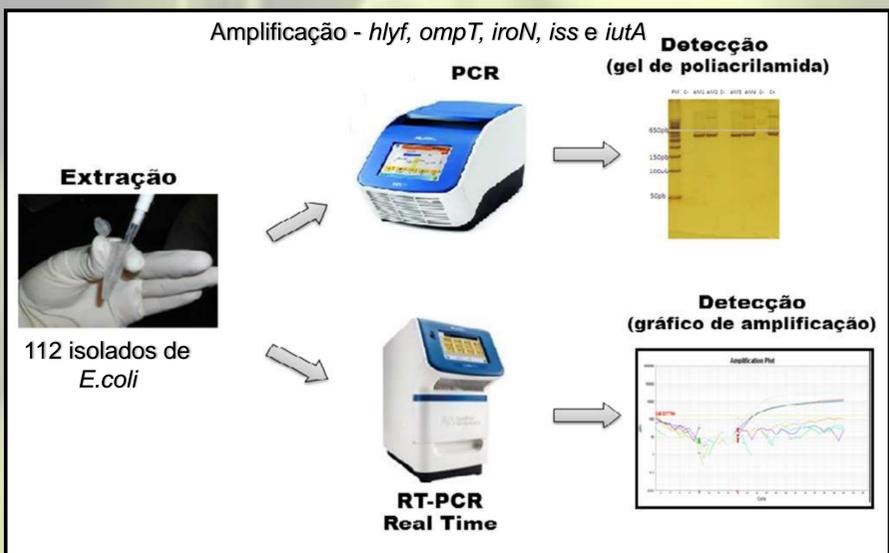
OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi comparar o método de PCR convencional descrito (padrão de referência) com a PCR em tempo real desenvolvida previamente pelo nosso grupo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para comparação das técnicas, foram analisadas 112 amostras de campo isoladas a partir de órgãos de aves de produção (galinhas e perus).

A extração do DNA foi realizada através do método de sílica, e a amplificação dos 5 alvos (*hlyF*, *ompT*, *iroN*, *iss* e *iutA*) através das duas técnicas. (Figura 1)



CONCLUSÃO

O presente estudo indica que a técnica desenvolvida apresenta alta concordância, sensibilidade e especificidade, e assim mostra-se adequada na tipificação de APEC e AFEC.

REFERÊNCIAS

- 1-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.
- 2-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.
- 3-NAKAZATO, G.; CAMPOS, T.A.; STEHLING, E.G.; BROCCCHI, M.; SILVEIRA, W.D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesq Vet Bras.*, v.29, n.7, p.479-486, 2009.

RESULTADOS

Pela PCR convencional (referência), 63 isolados foram classificados como APEC e 49 isolados classificados como AFECs (Tabela 1). Foi utilizado o mesmo critério de avaliação na PCR em tempo real (≤ 3 FVs = AFEC).

Tabela 1: Número de fatores de virulências detectados em APEC e AFEC

| | FV | (n) | (%) | Total Parcial |
|-------------------|-----|-----|------|---------------|
| AFEC | 0-1 | 39 | 79,6 | 49 |
| | 2-3 | 10 | 20,4 | |
| APEC | 4 | 16 | 25,4 | 63 |
| | 5 | 47 | 74,6 | |
| Total de Amostras | | | | 112 |

Os alvos *hlyF*, *ompT*, *iroN* e *iutA* apresentaram 100% de sensibilidade, especificidade e concordância, porém o alvo *iss* apresentou baixa concordância (84,7%) e especificidade de 66,7%, deixando a análise global de especificidade e concordância inferiores à 100%. A análise comparativa entre as duas técnicas é ilustrada na tabela 2.

Tabela 2: Análise comparativa das técnicas.

| PCR convencional X PCR em Tempo Real | |
|--------------------------------------|-------|
| Concordância | 98,2% |
| Sensibilidade | 100% |
| Especificidade | 95% |

A total confluência de resultados não foi verificada devido a 2 amostras onde o método de referência detectou 3 FVs enquanto a PCR em tempo real 4. A análise individual dos FVs verificou que esta pequena discrepância estava relacionada com o alvo *iss*, que apesar de detectado em todos os APECs por ambas as técnicas, nas AFECs foi detectado em maior número pela PCR em tempo real. A comparação de sequências do gene *iss* presente em APECs e AFECs demonstra que este gene é muito conservado, e que provavelmente a diferença encontrada possa estar relacionada com um dos iniciadores da técnica de referência, que compreende uma pequena região do plasmídeo externo ao gene.



MODALIDADE
DE BOLSA

PIBIC/CNPq