



Evento	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2013
Local	Porto Alegre - RS
Título	Eficiência da PCR em tempo real na caracterização de Escherichia coli comensais e patogênicas de aves
Autor	VINICIUS PROENÇA DA SILVEIRA
Orientador	NILO IKUTA
Instituição	Universidade Luterana do Brasil

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 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. 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. Os iniciadores e sondas estão localizados nos mesmos 5 genes analisados na técnica convencional. 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 através das duas técnicas. Pela PCR de referência, 63 isolados foram classificados como APEC, onde foram detectados 5 (74,6%) ou 4 (25,4%) FVs. Dos 49 isolados classificados como AFECs respectivamente 79,6% apresentaram 0 e 1 FVs e 20,4% entre 2 a 3. Utilizando o mesmo critério de avaliação na PCR em tempo real (≤ 3 FVs = AFEC), a concordância entre as duas técnicas foi de 98,2%, sensibilidade de 100% e especificidade de 95,9%. 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. A PCR em tempo real é cada vez mais utilizada nas agroindústrias do país por ser mais rápida, prática, com menor subjetividade de análise e com menor risco de contaminação quando comparada com a PCR convencional. 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.