



Avaliação do duplex PCR em tempo real *iss/ iutA* na identificação de *Escherichia coli* patogênica das Aves (APEC)

Vinicius Proença da Silveira ¹, Sílvia de Carli ¹, Fernanda Kieling Moreira Lehmann ³, Vagner Ricardo Lunge ^{2,3}, Fabiana de Oliveira Solla Sobral ⁴, Nilo Ikuta ^{2,3}
1-Graduação Medicina Veterinária/ULBRA, 2-Docente ULBRA, 3-Laboratório de Diagnóstico Molecular/ULBRA, 4-PPGBio Saúde/ULBRA

E-mail: vinicius-dasilveira@hotmail.com

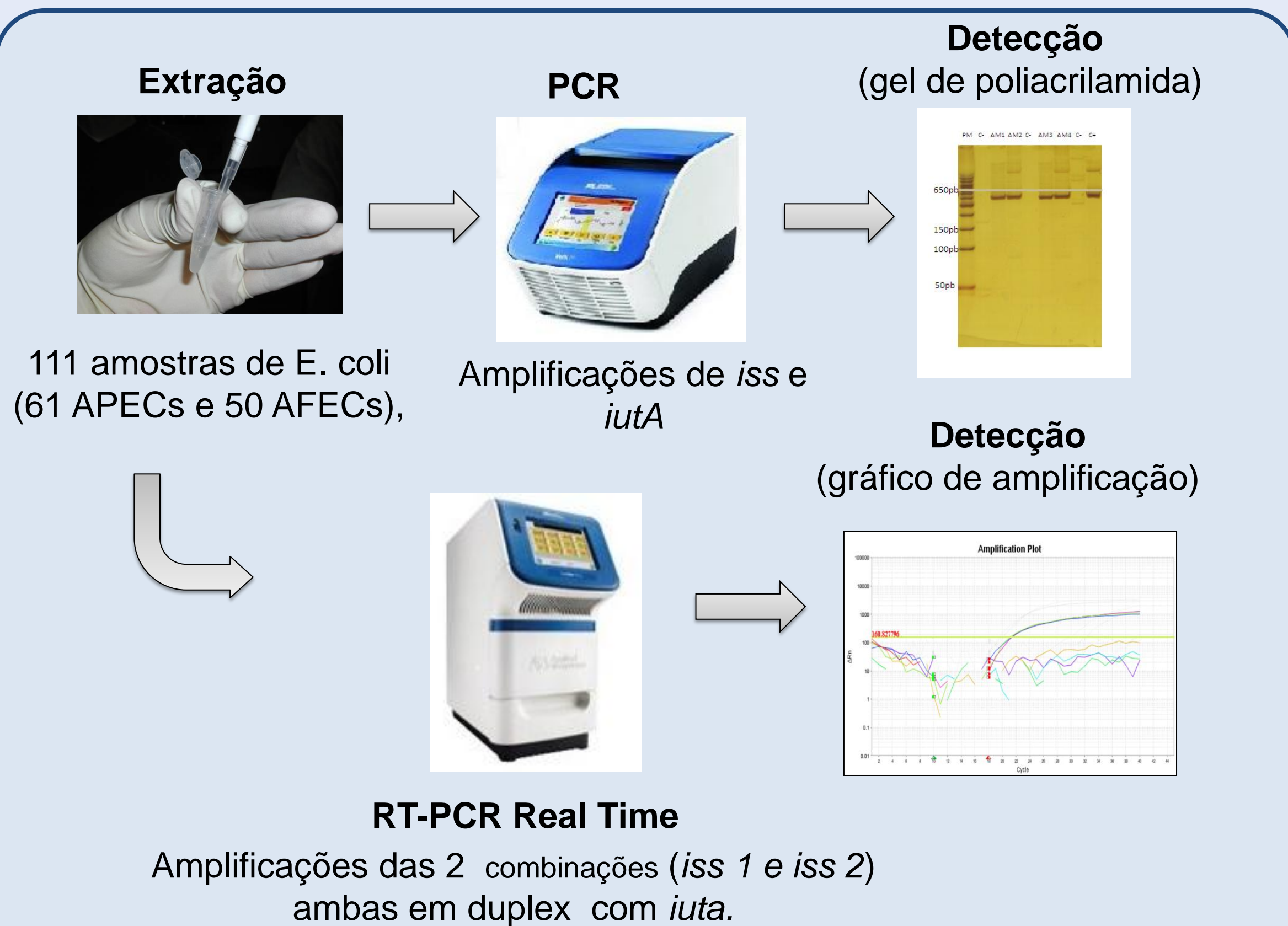
INTRODUÇÃO

A colibacilose está relacionada com grandes prejuízos na avicultura industrial e a *Escherichia coli* patogênica das Aves (APEC) é o agente etiológico desta enfermidade. A identificação deste patógeno é dificultada pela presença de cepas comensais na microflora intestinal (AFEC - *Avian Fecal Escherichia coli*). Atualmente já é conhecido que APECs diferem dos AFECs por carregarem um grande conjunto de fatores de virulência (FV) majoritariamente localizados em plasmídeos. Atualmente a diferenciação destas cepas é baseada na detecção dos FVs plasmidiais *iroN*, *iss*, *iutA*, *hlyF* e *ompT* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Nosso grupo tem trabalhado no desenvolvimento de uma metodologia mais prática e rápida para detecção dos mesmos FVs pela PCR em tempo real. Até o momento, obteve-se êxito no acerto dos alvos *hlyF*, *ompT* e *iroN* que apresentaram 100% de concordância de resultados com a PCR convencional (padrão ouro). Observou-se, porém, que a amplificação conjunta dos alvos *iutA* e *iss* apresentou uma concordância mais reduzida, devido a resultados falsos positivos gerados pelo *iss*.

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo melhorar a eficiência do teste, através da utilização de 2 novas combinações de iniciadores para detecção de *iss* testadas conjuntamente com *iutA*.

MATERIAIS E MÉTODOS



A primeira combinação de iniciadores (*iss 1*) consistiu de sequências presentes na região interna do gene *iss* e a segunda (*iss 2*) uma sequência interna ao *iss* e outra que se localiza numa região adjacente ao gene (sequência plasmidial). A sequência dos iniciadores de ambas as técnicas é demonstrada na tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores dos dois métodos.

	Name	Sequência de oligonucleotídeos (50–30) ^a	Gene Posição
PCR em tempo real	<i>iss-1</i>	TTTCTGCACCGCCACAAA	476-493
		CGGGAATTGGACAAGAGAAAAC	437-458
		VIC-TTTGGCTGCATCAAC-NFQ	460-474
	<i>iss-2</i>	TTTCTGCACCGCCACAAA	476-493
		CAGCAACCCGAACCACTTGATG	20-41*
		VIC-TTTGGCTGCATCAAC-NFQ	460-474
<i>iutA</i>	CGGTGGCGTACGCTATCAGT	897-916	
	GCGCGTAGCCGATGAAAT	858-875	
	FAM-CACTGAAAACAAGATTGAT-MGB	877-895	
PCR convencional	<i>iss</i>	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	20-41*
		AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA	324-344
	<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	1499-1520
CGTCGGGAACGGGTAGAAATCG		1219-1239	

RESULTADOS

O alvo *iutA* apresentou os mesmos resultados nas 2 combinações na PCR em tempo real quando comparadas com a PCR convencional (tabela 2), indicando estar adequado para a tipificação de APECs.

Comparando os resultados das combinações *iss 1* e *iss 2*, com o teste padrão, verificou-se aumento na especificidade, concordância e índice Kappa, como é mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Análise comparativa das combinações 1 e 2 no duplex com *iutA*

	PCR convencional X PCR em Tempo Real		
	<i>iutA</i>	<i>iss 1</i>	<i>iss 2</i>
Concordância	100%	84,7%	100%
Especificidade	100%	66,7%	100%,
Sensibilidade	100%	100%	100%
Kappa	1	0,68	1

O teste de X^2 demonstrou que a comparação da combinação *iss 1* com a PCR convencional apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), enquanto a segunda combinação apresentou melhores resultados, sem diferenças significativas.

A estratégia da combinação 2, que inclui um iniciador no gene *iss* e outra na região plasmidial adjacente ao gene foi utilizado também no desenho dos iniciadores deste alvo na PCR convencional.

CONCLUSÃO

Para tipificação conjunta dos 5 FVs utilizando a nova combinação de iniciadores, verificou-se completa concordância de resultados, demonstrando que a nova técnica é adequada para diferenciação de APECs de AFECs.

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.