

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais)**  
**para a Classificação de Patogenicidade de**  
**Amostras de *Escherichia coli* Isoladas de**  
**Frangos de Corte**

**Autor: Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha**  
**Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de**  
**Doutor em Ciências Veterinárias na especialidade de**  
**Sanidade Avícola**  
**Orientador: Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle**

**Porto Alegre, 2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha**

**Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais)  
para a Classificação de Patogenicidade de  
Amostras de *Escherichia coli* Isoladas de  
Frangos de Corte**

---

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Benito Guimarães Brito

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

Membro da Comissão

## FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Ana Cristina Gonçalves Pinto da  
Utilização de Inteligência Artificial para a Classificação de Patogenicidade de Amostras de *Escherichia coli* Isoladas de Frangos de Corte./ Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha. – Porto Alegre: UFRGS, 2006.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2006. Salle, Carlos Tadeu Pippi, Orient.

*Escherichia coli* – Redes neurais de inteligência artificial 2. Fatores de Virulência 3. Celulite – Problemas Respiratórios I. Título I I. Salle, Carlos Tadeu Pippi, Orient.

*Aos meus pais e irmãos que com  
amor e compreensão sempre me  
impulsionaram a novas  
conquistas.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Carlos Tadeu Pippi Salle, pela orientação, confiança entusiasmo e incentivo, fatores determinantes no desenvolvimento deste trabalho.

A Ari Bernardes da Silva maior incentivador e entusiasta do "Projeto *E. coli*", pela amizade, confiança e ensinamento valiosos para o crescimento profissional mas principalmente para o crescimento como ser humano.

A Cleber Taylor de Melo Carneiro, pela compreensão ao ter possibilitado o meu afastamento das atividades profissionais, para a realização deste trabalho.

A Silvio Luis da Silveira Rocha, pelo carinho, companheirismo, incentivo e colaboração técnica e científica indispensáveis e execução deste trabalho.

A Guilherme Fonseca de Souza, pelo companheirismo, incentivo e pela elaboração do IP sem o qual este trabalho não estaria completo.

A Hamilton de Souza Moraes, pelo estímulo, sugestões, auxílio técnico científico e correções nessa dissertação.

A Carlos André da Veiga Lima Rosa, pela valiosa colaboração técnica e científica.

A Vladimir Pinheiro do Nascimento, pelo incentivo.

A Obiratã Rodrigues, pela coleta e isolamento das amostras.

A Felipe de Oliveira Salle, Priscila Rech Pinto e Lucas Brunelli de Moraes pelo carinho e colaboração essencial na execução deste projeto.

A. Egídio Henrique Reali, pela confiança, apoio e incentivo.

A Luiz Henrique Ribas e Omar de Oliveira pela atenção, solidariedade e colaboração durante deste trabalho.

Aos demais colegas e estagiários do CDPA pela colaboração durante deste trabalho.

A Benito Guimarães de Brito e Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso pela cessão das amostras utilizadas como referência neste trabalho.

A Vera Wald pelas análises estatísticas e atenção dispensada.

A Rui Fernando Felix Lopes pela compreensão, atenção e cessão do termociclador, essencial a realização deste trabalho.

A Felipe Lohmann Arend pela atenção e colaboração.

A Marco Aurélio Dolado da Silva pelo incentivo e apoio na aquisição de materiais indispensáveis a execução deste trabalho.

A Silvana Rojas, pela amizade sincera e dedicada.

As funcionárias da Pós-Graduação, pelo apoio administrativo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico-CNPq pelo financiamento deste projeto.

**INDICE**

	pag.
<b>1. RESUMO</b>	08
<b>2. ABSTRACT</b>	11
<b>3. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>4. METODOLOGIA</b>	16
<b>5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	19
<b>6. ARTIGO 1</b>	47
<b>7. ARTIGO 2</b>	52
<b>8. ARTIGO 3</b>	66
<b>9. ARTIGO 4</b>	80
<b>10. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b>	97
<b>11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	103
<b>12. ANEXOS</b>	116

## 1. RESUMO

A *Escherichia coli* (*E. coli*), que foi por muito tempo esquecida como potencial patógeno, começa a ser vista sob nova ótica devido aos prejuízos econômicos que gera. No Brasil, entre 2001 e 2005, somente a condenação de carcaças, gerou um prejuízo estimado em 58 milhões de dólares à avicultura (Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006). Deste total, 19 milhões foram devido à presença de lesões cutâneas de celulite e 39 milhões ocorreram por lesões sistêmicas. Os avanços nas pesquisas e nas ferramentas utilizadas vêm resultando no maior entendimento dos mecanismos de patogenicidade das *E. coli* e cada vez mais é demonstrada a grande importância da interação dos diversos fatores de virulência na determinação da patogenicidade. Entretanto, a diferenciação de cepas virulentas e avirulentas continua sendo um problema no diagnóstico e, por consequência, na tomada de decisão pelos veterinários de campo. Nesta tese constam quatro Artigos científicos. O Artigo 1 trata dos fatores de virulência de 63 amostras de *E. coli* isoladas de frangos de corte com problemas respiratórios. Estas cepas foram examinadas para a presença de fatores de virulência, tendo sido analisadas as propriedades de resistência aos antimicrobianos, produção de hemolisinas, motilidade, capacidade de hemaglutinação, presença do operon *pap*, produção de colicinas e resistência sérica. A capacidade de hemaglutinar hemácias de cobaio foi verificada em 84,1% das amostras. Em 76,4% das amostras, foi

detectada a presença o operon *pap*. A produção de colicinas foi observada em 87,3% e em 88,9% foi verificada a expressão da resistência sérica. No Artigo 2, 238 amostras de *E. coli*, isoladas de cama de aviário e lesões de celulite, foram testadas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para detecção de sete genes de virulência responsáveis pela capacidade de adesão, fimbria P (*papC*) e fimbria F11 (*felA*), produção de colicinas (*cvaC*), presença de aerobactina (*iutA*), resistência sérica (*iss*), hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) e presença de dois antígenos capsulares K1 e K5 (*kpsII*). O gene *cvaC* foi detectado em 31,3% das amostras de celulite e em 11,5% das isoladas de fezes. Nos dados obtidos neste estudo 80,6% das amostras de celulite e 53,8% das de fezes apresentaram o gene *iss*. Para o *kps* a positividade foi evidenciada em 27% das cepas de celulite e em 7% das isoladas de fezes. O gene *iutA*, foi detectado em 51,3% das amostras de celulite e em apenas 19,2% nas isoladas de fezes. O gene *papC* ocorreu em 46,9% das amostras de celulite e em 30,8% das de fezes. Nas amostras de celulite estudadas, 3,8% apresentaram positividade para gene *felA*, enquanto nas amostras de fezes este percentual foi de 1,3%. O gene *tsh* foi detectado em 83% dos isolados de lesão em 14% nos de fezes%. Em seis genes, *cvaC*, *iss*, *iutA*, *kpsII*, *papC* e *tsh* foi detectada diferença estatística significativa entre os isolados de lesões de celulite e cama. No Artigo 3 um total de 61 amostras de *E. coli*, isoladas de frangos de corte com problemas respiratórios foram testadas através da PCR, para a presença dos genes responsáveis pela capacidade de adesão, fimbria P (*papC*) e fimbria F11 (*felA*), produção de colicinas (*cvaC*), presença de aerobactina (*iutA*), resistência sérica (*iss*), hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) e presença dos antígenos capsulares K1 e K5 (*kpsII*). O gene *iss* foi detectado em 73,8%, *tsh* em 55,7%, *iutA* em 45,9%, *felA* em 39,3%, *papC* em 24,3%, *cvaC* em 23% e *kpsII* em 18%. No Artigo 4 são apresentadas três redes neurais artificiais que foram desenvolvidas através da análise dos genes *papC*,

*felA*, *cvaC*, *iutA*, *iss*, *tsh* e *kpsII*, da motilidade e do índice de patogenicidade (IP) para realizarmos a predição ou classificação de patogenicidade de cepas de *E. coli* sem a necessidade da utilização de animais. Na Rede 1, utilizando 11 categorias de IP obtivemos 54,27% de acerto. No intuito de melhorar o desempenho do modelo foi criada uma segunda rede, utilizando 3 categorias de IP obtendo-se a classificação correta em 80,55%. Na tentativa de melhorar ainda mais seu desempenho, passamos a trabalhar com apenas duas categorias construindo, desta forma, a Rede 3. Com esta nova configuração a classificação correta do IP foi de 83,96%.

## 2. ABSTRACT

*Escherichia coli* (*E. coli*), which has been forgotten as a potential pathogen for a long time, is now being seriously considered due to the economical losses it generates. In Brazil from 2001 to 2005 the condemnation of carcasses represented a loss of about 58 million dollars to the poultry industry (Brasil/ Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006). From this total 19 million dollars were due to skin lesions and 39 million dollars to systemic lesions. There have been improvements in the comprehension of the mechanisms of pathogenicity. However, the differentiation of virulent from non-virulent samples is still a problem for veterinarians to come to a diagnosis and, as a consequence, to make decisions. Article 1 is about factors of virulence in *E. coli* isolates from chicken flocks presenting respiratory problems. The samples from litter were probed for the presence of factors of virulence and antimicrobial resistance. The following properties were analyzed: hemolysin production, motility, operon *pap* presence, colicin production and serum resistance. The capacity of hemagglutination was verified in 84.1% of the samples. In 76.4% of the samples operon *pap* presence was detected. Colicin production was observed in 87.3% and in 88.9% serum resistance was verified. In article 2, 238 *E. coli* samples were probed by Polymerase Chain Reaction (PCR) for the presence of seven virulence genes responsible for adhesion capacity, P fimbriae (*papC*) and F11 fimbriae (*felA*), colicin production

(*cvaC*), aerobactin presence (*iutA*), serum resistance (*iss*) temperature-sensitive hemmagglutinin (*tsh*) and presence of K1 and K5 capsular antigens (*kpsII*). The *CvaC* gene was detected in 31.3% of the cellulitis samples and in 11.5% of feces samples. In the present study 80.6% of the cellulitis samples and 53.8% of feces samples presented the *iss* gen. The *kps* was positive in 27% of the cellulitis and in 7% of the feces samples. The *papC* gene occurred in 46.9% of cellulitis and in 30.8% in feces samples. In cellulitis samples 3.8% were positive for the *felA* gene whereas in feces samples were 1.3%. The *tsh* gene was positive in 83% of the isolates from lesions and in 14% of feces samples. For *cmvaC*, *iss*, *iutA*, *kpsII*, *papC* and *tsh* genes significant statistical differences were detected for isolates from lesions and litter. In article 3 an amount of 61 *Escherichia coli* isolates from chicken flocks with respiratory problems were probed by the Polymerase chain Reaction (PCR) for the presence of the genes which are responsible for the adhesion capacity, P fimbria (*papC*) and F11 fimbria (*felA*), colicin production (*cvaC*), aerobactin presence (*iutA*), serum resistance (*iss*), temperature-sensitive hemmagglutinin (*tsh*) and presence of K1 and K5 capsular antigens (*kpsII*). The *iss* gene was detected in 73.8%, the *tsh* in 55.7%, the *iutA* in 45.9%, the *felA* in 39.3%, the *papC* in 24.3%, the *cvaC* in 23% and *kpsII* in 18%. Article 4 presents three neural nets of artificial intelligence which were developed through the analysis of *papC*, *felA*, *cvaC*, *iutA*, *iss*, *tsh* and *kpsII* genes, motility and pathogenicity index (PI) in order to establish predictions and classifications of the pathogenicity of *E. coli* litter without using animals. Net 1 obtained 54.27% of correctness using 11 categories of IP. In order to improve the performance of the model, a second net was created using 3 categories of IP the correct classification of 80.55%. Trying to get an even better performance, we worked with only two categories, building this way the third net. With this new configuration the correct classification was 83.96%.

### 3. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é hoje uma das mais importantes do globo e tem se mantido como o segundo maior produtor e exportador de carne de frango do mundo. A evolução da produção nacional teve impulso expressivo a partir da década de 70. Nestes trinta e cinco anos, a produção de carne de frango cresceu de 217 mil toneladas em 1970 para 9,2 milhões de toneladas em 2005, o que representa um acréscimo de mais de 4.000%. Como fonte de proteína nobre e barata, teve um consumo per capita de 35,4 kg/hab em 2005. A constante evolução da avicultura nacional propiciou a conquista de novos mercados e o crescimento das exportações de carne de frango. Apesar do número crescente de barreiras protecionistas, sejam elas tarifárias ou sanitárias, que o nosso produto continua enfrentando, em 2005 o Brasil exportou para 142 países o que representou uma receita de US\$ 3,5 bilhões, 35% maior que a de 2004 (União Brasileira de Avicultura, 2006). A crescente competição nos mercados e as exigências de melhores produtos com redução de antimicrobianos, melhores preços e maiores garantias sanitárias, tornam necessário que a cada dia a nossa produção seja mais eficiente. Neste cenário, o aumento dos índices de produtividade em toda a cadeia avícola torna-se vital para a sobrevivência e expansão do setor.

Neste cenário a *Escherichia coli* (*E. coli*), que foi por muito tempo esquecida como potencial patógeno, começa a ser vista sobre nova ótica devido aos prejuízos econômicos que gera. No Brasil, entre 2001 e 2005, somente a condenação total e parcial de carcaças, que ocorreram devido à presença de lesões em que a *E. coli* é considerada, pelo Serviço de Inspeção Federal o agente responsável, geraram um prejuízo estimado em 58 milhões de dólares à avicultura e deste total, 19 milhões foram devido à presença de lesões cutâneas de celulite e 39 milhões ocorreram por lesões sistêmicas (Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006).

As lesões de pele em frangos de corte são um importante problema na moderna indústria avícola, sendo considerada a principal causa de condenação de carcaças nas plantas de abate (Norton et al., 1997).

Em diversos países a celulite vem sendo responsável por prejuízos econômicos. No Canadá, a celulite é a principal causa de condenação em frangos de corte (Stocki et al., 2002) e entre 1986 e 1996 a porcentagem de condenação de carcaças de frangos de corte devido à celulite aumentou 11,8%. Somente em 1996 mais de 2,6 milhões de frangos foram descartados em virtude de lesões relacionadas à celulite, o que representou 0,568% do total de frangos processados (Kumor et al., 1998).

Nos Estados Unidos estima-se uma perda anual superior a 80 milhões de dólares (Norton et al., 1999).

A *E. coli* é parte da microbiota normal, entretanto de 10 a 15% podem ser potencialmente patogênicas. As restrições crescentes a utilização de medicamentos em animais destinados ao consumo humano e os prejuízos econômicos relacionados às lesões causadas pela *E. coli* tornam cada vez mais urgentes à adoção de metodologias capazes de realizar classificação do grau de patogenicidade potencial das amostras. Isto irá permitir que a utilização de drogas para o controle da infecção seja realizada

somente quando a presença do microrganismo representar real risco à sanidade e à produtividade do plantel. Acreditamos que uma das ferramentas que tem potencial para o auxílio nesta classificação seja a utilização de modelagens matemáticas, em especial as redes neurais artificiais.

Estes processos, apesar de não serem bem conhecidas pelos profissionais das áreas ligadas a biologia, vem sendo cada vez mais utilizados. Os primeiros trabalhos relacionados a área biológica foram publicados em 1991. Na área avícola os primeiros modelos utilizando redes foram publicados por Zhang et al. (1996) e Elfadil et al. (1996). No Brasil, pesquisadores do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária - CDPA/Universidade Federal do Rio Grande do Sul utilizaram modelos matemáticos para explicar a resposta imunológica em reprodutoras e os danos causados por micotoxinas (Salle et al. 1999). O mesmo grupo de pesquisadores publicou trabalhos com inteligência artificial para o gerenciamento de reprodutoras em recria (Salle et al. 2001a) e na fase de produção (Salle et al. 2001b)

O número de publicações na área de bacteriologia onde a utilização desta tecnologia está sendo associada vem crescendo a cada ano. Em recente pesquisa bibliográfica localizamos 187 trabalhos nesta área que utilizaram redes neurais. Destes, 46 associaram esta nova tecnologia a métodos convencionais de bacteriologia, bioquímica e biologia molecular no estudo de amostras de *E. coli*. Entretanto, não foi localizada nesta revisão de literatura nenhuma publicação que tenha relação à classificação da *E. coli* quanto aos seus fatores de virulência ou índices de patogenicidade.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Estruturação da tese

#### 4.1.1. Revisão bibliográfica:

Será apresentada uma breve revisão geral da literatura englobando aspectos relativos a colibacilose, aos fatores de virulência da *E. coli* e a utilização das redes neurais de inteligência artificial, uma vez que cada um dos Artigos anexados têm sua própria revisão bibliográfica referente ao assunto que abordará.

#### 4.1.2. Trabalhos científicos:

##### 4.1.2.1. Artigo 1:

### **"Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil"**

Amostras de *E. coli*, isoladas de frangos de corte com problemas respiratórios, foram examinadas para a presença de fatores de virulência, tendo sido analisadas as propriedades de resistência aos antimicrobianos, produção de hemolisinas, motilidade, capacidade de hemaglutinação, presença do operon *pap*, produção de colicinas e resistência sérica.

Publicado - Avian Dis. v.46, n.3, p.749-753, 2002

#### 4.1.2.2. Artigo 2:

### **"Genetic Profile of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from cellulitis lesions and poultry litter"**

Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), 238 amostras de *E. coli* isoladas de lesões de celulite e cama foram testadas para detecção dos genes de virulência *papC*, *felA*, *cvaC*, *iutA*, *iss*, *tsh* e *kpsII*.

Enviado para publicação: Brazilian Journal of Microbiology.

Anexo II: Documento de comprovação de recebimento emitido pela Revista.

#### 4.1.2.3. Artigo 3:

### **"Genetic Profile of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry".**

Neste estudo um total de 61 amostras de *E. coli*, isoladas de frangos de corte com problemas respiratórios foram testadas através da PCR, para a presença dos genes de virulência *papC*, *felA*, *cvaC*, *iutA*, *iss*, *tsh* e *kpsII*.

Enviado para publicação: Pesquisa Veterinária Brasileira.

Anexo I: Documento de comprovação de recebimento emitido pela Revista.

#### 4.1.2.4. Artigo 4:

### **"Utilização de Inteligência Artificial para a Classificação de Patogenicidade de Amostras de *Escherichia coli* Isoladas de Frangos de Corte"**

Neste trabalho foram construídas redes neurais artificiais, com a utilização das informações de índice de patogenicidade e perfil genético de 293 amostras de *E. coli*, com o objetivo de possibilitar a classificação de novas cepas sem a utilização de animais.

A ser enviado para publicação

#### 4.1.3. Discussão e conclusões

Serão abordados os principais aspectos dos quatro trabalhos científicos de forma a estabelecer sua interligação e possibilitar conclusões gerais.

## 5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O microrganismo que hoje conhecemos como *Escherichia coli* (*E. coli*) foi primeiramente descrito por Theodor Escherich, que em 1885, a partir de fezes de crianças saudáveis e atribuiu-lhe o nome de *Bacterium coli commune* (Sussman, 1985; Bettelheim, 1994).

A *E. coli* é um típico membro da família *Enterobacteriaceae*, sendo um bastonete curto que mede de 1,1 a 1,5 $\mu$ m por 2,0 a 6,0  $\mu$ m, podendo ser móvel pela presença de flagelos peritríqueos. Em esfregaços corados é Gram negativo, e apresenta-se isolado ou em pares (Sussman, 1985; Bettelheim, 1994). Por muitos anos foi considerada apenas como um microbiota normal (Bettelheim, 1994) do trato gastrointestinal de animais e do homem (Cavalieri et al., 1984). Está presente na maioria dos mamíferos e aves, e no trato respiratório superior das aves (North, 1978; Morris & Sojka, 1985). No trato intestinal das galinhas apresenta-se na concentração de 10<sup>6</sup>/g de fezes (Barnes & Gross, 1997).

As lesões por ela causadas, como agente primário e principalmente secundário, geram prejuízos econômicos decorrentes do aumento da mortalidade embrionária; do menor desenvolvimento corpóreo das aves, do aumento do índice de conversão alimentar, aumento da mortalidade, dos custos com medicamento e das condenações de carcaças (Barnes & Gross, 1997).

O termo colibacilose vem sendo utilizado como indicativo de infecções localizadas ou sistêmicas, causadas total ou parcialmente pela *E. coli*, incluindo no caso das aves, a celulite, colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, pericardite, periepatite, salpingite, coligranuloma, síndrome da cabeça inchada, panoftalmia, osteomielite/sinovite e onfalite e quando associada ao *Mycoplasma sp.*, a Doença Crônica Respiratória complicada - DCR (Gross, 1994). Nos mamíferos, a colibacilose é normalmente uma doença entérica primária, porém nas aves, é tipicamente localizada e de origem secundária, podendo tornar-se sistêmica quando as defesas do hospedeiro estiverem deprimidas, por fatores infecciosos ou não (Barnes & Gross, 1997). Em 1955, Fathery relatou o primeiro isolamento de *E. coli* em saco aéreo de aves. Atualmente a doença crônica respiratória ainda é a forma de colibacilose aviária mais estudada e de maior prevalência nos planteis avícolas (Gross, 1994). Entretanto, a celulite está chamando a atenção de pesquisadores pelos crescentes prejuízos econômicos que vem acarretando em função da condenação de aves nos abatedouros devido a lesões cutâneas (Elfadil et al., 1996). Os dados obtidos por Fallavena, (2000), estudando 800 amostras de pele, demonstraram que a celulite foi a doença mais freqüentemente diagnosticada.

As amostras patogênicas de *E. coli* aviárias utilizam duas vias principais para atingir a circulação sistêmica. A via respiratória é comumente citada como a via natural de infecção (Gjessing & Berkoff, 1989; Dozois et al., 1994), onde ocorre a penetração de amostras virulentas (Carlson & Whenham, 1968) após a adesão, mediada por fimbrias, às células epiteliais do trato respiratório de frangos e perus (Naveh et al., 1984). Para que a via cutânea ocorra existe a necessidade de que a pele sofra um trauma, e esta lesão seja contaminada maciçamente por *E. coli*. (Norton et al., 1997) e

que alguma destas cepas apresentem características de virulência compatível com septicemia.

Nas infecções respiratórias, a *E. coli* pode ser o agente primário (Gjessing & Berkhoff, 1989). Porém, como agente secundário a infecção pode ocorrer após lesão da mucosa por outros agentes, tais como os pertencentes ao genero *Mycoplasma* (Moorhead & Saif, 1970; Saif et al. 1970; Morris & Sojka, 1985; Gross, 1990; Gross, 1994), o vírus da bronquite infecciosa (Harry & Hemsley, 1965; Yoder et al. 1989) e o vírus da Doença de Newcastle (Gross, 1961; Gross, 1990), incluindo as amostras vacinais, ou agentes químicos como a amônia (Lang, 1992; Barnes & Gross, 1997).

Após a penetração, através da camada epitelial da traquéia e dos sacos aéreos, a *E. coli* está apta a atingir órgãos internos, levando a quadros de pericardite, periepatite (Gross, 1961), septicemia (Gjessing & Berkhoff, 1989; Brée et al., 1989), salpingite, sinovite, onfalite e aerossaculite (Gross, 1990). A penetração através do trato respiratório parece ser modulada pela presença da microbiota bacteriana, que compete com as amostras virulentas de *E. coli* pela colonização do trato respiratório (Dho & Lafont, 1982; Brée et al., 1989).

A celulite na maioria dos casos caracterizar-se pela ocorrência de pequenas lesões e freqüentemente é diagnosticada somente após o abate das aves e infelizmente na grande parte das vezes somente são visualizadas com a exposição do tecido subcutâneo (Norton et al., 1997).

Apesar desta patologia poder ocorrer em qualquer parte do corpo da ave entretanto, a maior prevalência envolve as regiões das sobrecoxas e peito. Esta também é a forma com maior significância econômica, uma vez que ao abate acarreta a condenação total da carcaça ou de partes nobres de carne, peito, coxas e sobrecoxas.

Nos últimos vinte anos ocorreram modificações significativas na forma de produção de frangos. Algumas destas alterações colaboraram para o aumento das lesões de pele, entre elas a celulite. O aumento da ocorrência de traumatismos, principalmente dos arranhões em decorrência da maior densidade populacional no galpão, a utilização de práticas de restrição alimentar que geram maior competição pelo alimento, a seleção genética das aves que ocasionaram retardo no empenamento são alguns destes fatores. A umidade da cama e seu grau de compactação também influem na ocorrência da doença. Camas úmidas favorecem a permanência e multiplicação bacteriana enquanto camas compactadas favorecem lesões principalmente na região do peito. Temperaturas altas causam diminuição da velocidade do empenamento favorecendo o aparecimento da celulite. Este é um dos fatores responsáveis pela maior ocorrência da patologia no verão (Elfadil et al., 1996). Como nos quadros respiratórios, a ocorrência de fatores infecciosos ou não que levem a imunodepressão, tais como a doença de Gumboro, anemia infecciosa das galinhas e de micotoxinas, entre outras, são incluídas como importantes fatores predisponentes da celulite (Nakamura et al., 1990).

Os lotes afetados geram prejuízos econômicos através da perda direta do produto, diminuição na velocidade de processamento das aves no abatedouro, aumento do custo da mão de obra e perda de valor do produto final, além de gastos adicionais com a limpeza e desinfecção das instalações das plantas de processamento (Norton et al., 1997).

O diagnóstico macroscópico das doenças com manifestação cutânea não se constitui em tarefa fácil para os profissionais encarregados da inspeção nos abatedouros de aves. As lesões podem ter aspectos bastante semelhantes e como consequência os Serviços de Inspeção de muitos países, inclusive o do Brasil, têm a tendência de agrupá-las na categoria de dermatite ou dermatose (Kumor et al., 1998; Fallavena et al., 2000),

o que provavelmente nos leve a subestimar os prejuízos econômicos causados pela celulite.

A celulite aviária era descrita apenas como um processo inflamatório e foi primeiramente descrita de forma sistematizada na Inglaterra por (Randall et al., 1984). Esta patologia é geralmente acompanhada pela destruição da integridade da pele por traumatismos ou abrasão cutânea e pela presença de bactérias que tenham a capacidade de invasão e colonização do tecido subcutâneo. Nos mamíferos os *Streptococcus* e *Staphylococcus aureus* são os mais freqüentemente isolados. Nas aves a *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactia*, *Proteus spp.*, (Messier et al., 1993; Peighambari et al., 1995), *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas spp.* e *Citrobacter freundii* podem estar presentes associados ou não a *E. coli* (Norton et al., 1997, Norton et al., 1999). Peighambari et al. (1995) relatam também o isolamento da *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter agglomerans* e do *Proteus vulgaris* de lesões de celulite.

A *E. coli* é isolada com maior freqüência das lesões de celulite (Messier et al., 1993; Norton, 1996; Norton et al., 1997; Norton et al., 1999; Peighambari et al., 1995; Gomis et al., 2000) porém o isolamento de mais de um microrganismo de uma mesma lesão é possível (Messier et al., 1993). A *E. coli* foi isolada em mais de 90% das aves com celulite examinadas no Sirilanka (Gomis et al., 2000). No Canadá Messier et al. (1993) isolaram *E. coli* de 88,1% das amostras estudadas, Gomis et al. (2001) relata isolamento em 70,7%, e Elfadil et al. (1996) realizou o isolamento do microrganismo em 84%. No Brasil, Brito (2003) verificou a ocorrência em 65% das amostras analisadas.

A celulite foi reproduzida experimentalmente em laboratório por diversos autores (Johnson, 2001; Norton et al., 2000; Jeffrey et al., 1999 Norton et al, 1999; Pourbakhsh et al., 1997; Gomis et al., 1997; Ngeleka et al., 1996; Norton et al, 1996;

Peighambari, 1995). Não existe uniformidade nos protocolos de teste utilizados pelos autores. As idades das aves utilizadas nos experimentos variaram entre 3 e 28 dias. A reprodução das lesões ocorreu também com amostras que não tinham sido isoladas de lesões (Peighambari, 1995).

As lesões de celulite podem se desenvolver em menos de 24 horas (Norton et al., 1997) e se iniciam a partir da entrada das bactérias que invadem o tecido subcutâneo (Vaillancourt, 1998). Por ser uma região pouco vascularizada, a tentativa do organismo em debelar a infecção é a responsável pelo aparecimento das lesões. Estas podem medir de um a dez centímetros de diâmetro e caracteriza-se pela inflamação purulenta aguda e difusa do tecido subcutâneo, podendo envolver a camada muscular. Estão freqüentemente associadas à formação de abscessos que muitas vezes são denominadas placas. Casos de celulite aviária são freqüentemente associados à descoloração e ao espessamento da derme, e por esta razão também é denominada de dermatite necrótica e ou com características de favo de mel, “waffle skin” (Barnes & Gross, 1997), esta é considerada a lesão característica da celulite (Norton et al., 1997). Estas lesões já foram identificadas em frangos de corte em várias ocasiões (Messier et al., 1993; Peighambari et al., 1995; Elfadil et al., 1996a, Elfadil et al., 1996b; Gomis et al., 1997; Gomis et al., 2000; Gomis et al., 2001; Fallavena et al., 2000). A celulite foi caracterizada histopatologicamente por Fallavena et al. (2000) em 45,25% das 800 amostras estudadas. Microscopicamente, se caracteriza por alterações inflamatórias no tecido subcutâneo, muitas vezes com a formação de massas de restos celulares necróticos e bandas de fibrina geralmente envolvidas por tecido conjuntivo contendo heterófilos, linfócitos e macrófagos. Nos casos mais severos, a cápsula de tecido conjuntivo pode estar circundada por gigantócitos e por uma camada de fibroblastos em proliferação (Peighambari et al., 1995).

A celulite aviária é frequentemente classificada em dois tipos. A do Tipo I e a do Tipo II, de acordo com a área afetada e a extensão da lesão. A celulite do Tipo I seria resultante de problemas na incubação e na qualidade do pintinho e ocorre na região umbilical e a do Tipo II estaria associada à ocorrência de traumatismos na pele durante o crescimento das aves, podendo aparecer em diversas áreas do corpo. Entretanto, esta classificação proposta por Morris em 1991 não foi fundamentada cientificamente; logo não é recomendada (Norton et al., 1997).

A celulite possui etiologia multifatorial e a interação de fatores ligados ao manejo, nutrição, genética das aves, genética bacteriana, e a ocorrência de imunodepressão, podem ser decisivas no aparecimento da doença (Elfadil et al, 1996a, Elfadil et al, 1996b). Entretanto, somente ocorrerá a lesão caso não esteja mantida a integridade da pele e um grande número de bactérias entrem em contato com a lesão e sejam capazes de aderir, invadir e multiplicar-se no hospedeiro. (Gomis et al, 1997; Norton et al., 1997).

Por essas características, a *E. coli* é considerada como um patógeno de importância mundial na produção comercial de aves. Paralelamente, a resistência bacteriana às drogas antimicrobianas constitui-se em sério problema por limitar as possibilidades terapêuticas de tratamento das doenças bacterianas em aves. Esta resistência assume especial importância no tratamento de infecções sistêmicas por *E. coli*, por sua incidência ser economicamente significativa (Rosenberger et al., 1985; Barnes, 1994; Goren, 1994; Barnes & Gross, 1997).

A redução dos problemas com a colibacilose requer a busca de alternativas de manejo e genética das aves. Por outro lado, é essencial conhecer as características da genética bacteriana e determinar de forma objetiva seu potencial de patogenicidade.

Os mecanismos de virulência das amostras de *E. coli*, potencialmente patogênicas para aves (APECs), têm sido continuamente estudados e acredita-se ser multifatorial. Certas propriedades são associadas, primariamente, a amostras virulentas (Cavaliere et al., 1984; Dho & Lafont, 1984), entretanto, ainda não foi estabelecido um modelo capaz de realizar a classificação objetiva das cepas. Estes múltiplos fatores de virulência vêm sendo identificados em amostras de *E. coli* isoladas de aves, e entre os mais freqüentemente citados estão: a capacidade de adesão, a multiresistência a drogas antimicrobianas, a presença de aerobactina, a produção de colicinas, a resistência sérica, a motilidade, a produção de hemolisinas, a presença de grande número de plasmídios, a alguns sorogrupos (O1, O2, O35, O78, O115, O116, K1, K80), a produção de toxinas, a habilidade de colonização ou persistência na circulação e a invasividade celular (Barnes, 1994). Em amostras isoladas no Rio Grande do Sul os fatores mais freqüentemente detectados foram a resistência sérica e a produção de colicinas (Rocha et al., 2002). Por muitos anos, as subdivisões das *E. coli* foram baseadas apenas nas propriedades antigênicas das cadeias de polissacarídeos e lipopolissacarídeos, antígenos O, K e o antígeno de proteínas flagelares H. A importância dos antígenos O e K e suas influências na relação com o hospedeiro é estudada há bastante tempo, embora a natureza exata destas duas estruturas, como fatores de virulência, ainda não sejam completamente compreendidos.

Um novo antígeno vem sendo incluído nos estudos desta relação com o hospedeiro, o antígeno fimbrial F. Estes antígenos fimbriais não são essenciais para a manutenção da viabilidade do microrganismo no laboratório. Entretanto, devido a patogenicidade de muitas amostras de *E. coli* ser, em parte, atribuída às fimbrias (Suwanichkul & Panigrahy, 1988), a presença destas estruturas vem sendo considerada como um importante fator de virulência (Ørskov & Ørskov, 1983), uma vez que a

habilidade da bactéria em aderir ao epitélio do hospedeiro é um passo necessário para o desenvolvimento das infecções. A habilidade da *E. coli* em produzir fimbrias confere especial vantagem em termos de colonização (Dho & Lafont, 1982; Dho & Lafont, 1984; Naveh et al., 1984). As fimbrias, ou pili, são filamentos protéicos formados por subunidades peptídicas com diferentes pesos moleculares e especificidade sorológica (Jann *et al*, 1981; Ørskov & Ørskov, 1992), que atuam como fatores de aderência e colonização de células eucariontes (Naveh et al., 1984). A aderência é definida pela formação de ligações mecanicamente estáveis entre as bactérias e as células do hospedeiro e sua especificidade permite às bactérias a superação dos mecanismos fisiológicos de defesa do hospedeiro, colonizando e multiplicando com ou sem invasão subsequente.

A interação com as células da mucosa ocorre através do reconhecimento de receptores específicos da membrana plasmática da célula alvo pelas adesinas bacterianas (Ørskov & Ørskov, 1983; Eisenstein, 1987; Gyimah & Panigrahy, 1988).

A produção de fimbrias impõe um grande esforço à bactéria, considerando que a subunidade fimbrial pode representar aproximadamente 5 a 10% da expressão do total de proteína celular. O potencial de adesão da fimbria é determinado pela localização da adesina na mesma, na ponta ou ao longo da estrutura da fimbria. Em geral, as fimbrias são expressas *in vitro* a 37°C, em baixa pressão osmótica e limitadas concentrações de ferro e glicose (Smyth et al., 1994). A classificação das fimbrias e adesinas é determinada pela morfologia e habilidade de promover aglutinação de hemácias de diferentes espécies (Old, 1985; Lior, 1994). Em função desta característica, são também denominadas hemaglutininas (Eisenstein, 1987). Além da afinidade por hemácias, tem sido reconhecida a afinidade da *E. coli* por outros tipos celulares, indicando as adesinas como um fator de colonização que permite o estabelecimento do microrganismo em

vários sítios nas células do hospedeiro (Parry & Rooke, 1985). Entre as hemaglutininas, existe uma divisão simples: fimbrias as quais se previne a aglutinação quando incubadas com D-manose são denominadas D-manose-sensíveis e as demais, D-manose-resistentes (Ørskov & Ørskov, 1983; Eisenstein, 1987). A aderência D-manose-sensível mediada por *E. coli* é devida a presença de fimbria tipo 1 (F1). Esta adesina reconhece receptores resistentes (Ørskov & Ørskov, 1983; Eisenstein, 1987). Esta adesina reconhece receptores das células eucarióticas, que não a D-manose (Kiselius et al., 1989).

As adesinas D-manose-resistentes compreendem um grupo heterogêneo de estruturas bacterianas que se ligam a carboidratos presentes nos receptores celulares, que não a D-manose. A fimbria P liga-se especificamente ao carboidrato  $\alpha$ -D galactose e  $\beta$ -D galactose do antígeno do grupo sanguíneo P, presente nas hemácias humanas (Hoschützky et al., 1989). Os genes que codificam a fimbria P são cromossomais e podem estar presentes em mais de uma cópia. A fimbria P é um heteropolímero constituído de  $10^3$  subunidades helicoidais, com uma subunidade maior denominada *pap A*, constituindo o corpo da fimbria e três subunidades menores, *pap E*, *pap F* e *pap G*, que estão diretamente relacionadas à aderência; *pap H* é responsável pela terminação e implantação da fimbria na superfície celular. *Pap C* e *pap D* são requeridos para a polimerização e transporte das subunidades fimbriais, respectivamente. *Pap G* é a molécula de adesina que confere especificidade nas ligações  $\alpha$ -D galactose e  $\beta$ -D galactose (Lund et al., 1987). A biogênese da fimbria P tem sua expressão modulada por mecanismos de regulação locais e globais. O operon da fimbria P codifica dois reguladores, *pap I* e *pap B*. A proteína de *pap I* ativa a expressão de gene de *pap B* e a proteína de *pap B* ativa a expressão de seu próprio promotor, resultando em expressão nivelada da subunidade *pap A* fimbrial, desde que sejam ligados o *pap A* e genes de *pap*

*B* do mesmo promotor. Dozois et al. (1992), investigaram a ocorrência, entre *E. coli* isoladas de galinhas com septicemia e de perus saudáveis, de sucessões de nucleotídeos os quais hibridizaram com o *pap* e sondas de *pil*. Eles observaram que *pap*<sup>+</sup> isolados de galinhas eram associados com septicemia, mas, contudo não expressaram fimbria P. Quatro de nove *pap*<sup>+</sup> isolados de perus expressaram fimbria P.

Muitos autores relatam a ocorrência do gene *papC*. Em amostras isoladas de celulite Brito et al., (2003) constataram a presença em 19,6%, Ngeleka et al., (1996) em 51%, Gomis et al., (2001) em 37,1%, e Ngeleka et al., (2002) em 25%. Em amostras isoladas de fezes Ngeleka et al., (2002) encontraram o gene em 13% enquanto Brito et al., (2003) caracterizaram ausência deste gene nas amostras por ele estudadas. Outros autores também relataram a ocorrência deste gene em amostras isoladas de aves com septicemia. Ewers et al (2004) constataram a presença em 22,7% Ngeleka et al., (2002) em 25%. Resultados mais elevados são relatados por Rodriguez-Siek *et al.* (2005), 41,2%.

Uma variante sorológica da fimbria P (F11) é codificada pelo operon *felA* (De Ree et al., 1985). Brito et al., (2003) obtiveram 19% de amostras de celulite positivas para o *felA* enquanto em nenhuma das amostras de fezes o gene foi encontrado. Em amostras de colisepticemia Delicato et al., (2003) obtiveram 12%, enquanto Rodriguez-Siek et al. (2005) encontraram 78% de positividade.

A inversão de fase provavelmente constitui-se em um fator de virulência. A fase não fimbriada favoreceria a sobrevivência da *E. coli*, particularmente após alcançar o órgão alvo. Por esta razão, a bactéria realizaria a inversão de fase, de fimbriada para não fimbriada. Este fenômeno tem sido verificado em diferentes tipos fimbriais (Sheffer *et al.*, 1985). Esta inversão é controlada na fase de transcrição por um gene que codifica a subunidade estrutural e sua regulação envolve a inversão de um segmento de DNA de

314 pares de bases, que carrega o promotor *pil A - fim A*. Durante o processo de fimbriação, o promotor está orientado adequadamente, porém na fase não fimbriada ocorre a inversão da orientação e *pil A - fim A* não pode ser transcrito (Eisenstein, 1987).

A fimbria P também está sujeita a inversão de fase, influenciada por condições de crescimento em caldo ou ágar e pela temperatura de incubação. Mudanças de temperatura estão associadas a rearranjos de DNA próximos à região *pap B*, o que sugere uma mudança genética. Acredita-se que a variação de fase dos antígenos superficiais auxilie a bactéria a evitar respostas imunes específicas do hospedeiro (Göranson & Uhlin, 1984).

Em 1925, Andrea Gratia descobriu a propriedade de certos coliformes em produzir substâncias capazes de causar a morte de outras amostras de coliformes, denominando-as de colicinas (Luria & Suit, 1987; Hedges, 1990). Substâncias similares foram descritas em outras espécies com o nome de bacteriocinas (Lior, 1994).

A importância da produção de colicinas por bactérias invasivas, no processo de colonização, está relacionada à competição com a microbiota normal, presente nos tratos respiratório e gastrointestinal (Emery et al., 1992; Wooley et al., 1994).

As colicinas têm peso molecular de 40 a 60 *kDa* (Lior, 1994) e um grande número destas substâncias já foram identificadas e caracterizadas pela imunidade específica correspondente. Amostras colicinas-sensíveis possuem receptores específicos de ligação. Receptores definidos por mutações têm gerado bactérias mutantes resistentes a uma ou mais colicinas. Muitos destes receptores vêm sendo identificados como proteínas da membrana externa.

Em amostras produtoras de colicinas os determinantes genéticos e as proteínas que os acompanham estão localizados em plasmídios, denominados fatores Col. Todos

estes fatores são replicadores de DNA e independem do controle da replicação bacteriana, mas não dos produtos da transcrição bacteriana. Cada replicação tem uma única origem, seja *in vivo* ou *in vitro* (Luria & Suit, 1987).

Atualmente, a classificação realizada é baseada na organização de plasmídios Col e no modelo de ação das colicinas em bactérias sensíveis (Luria & Suit, 1987). As colicinas são classificadas em tipo V, A, B, Ia, Ib, Ic, K, N, E1, E2, E3 e DF13 (Luria & Suit, 1987; Lior, 1994). Suas ações estão baseadas em múltiplos processos (Lior, 1994). A colicina V inibe o crescimento bacteriano, interferindo com a formação do potencial de membrana (Yang & Kinsky, 1984); a E2 provoca desarranjos no DNA de células sensíveis; as E3 e DF13 inibem a síntese protéica através da paralisação dos ribossomos e as colicinas E1, Ia, Ib, A e K atuam na despolarização da membrana citoplasmática (Luria & Suit, 1987).

Ao contrário das outras, a colicina V é encontrada principalmente em bactérias virulentas implicadas em infecções extra-intestinais em humanos e animais. É uma molécula pequena e não é liberada da célula bacteriana através de sua lise, como ocorre com as demais, mas através de mecanismo de exportação (Gilson et al., 1987; Lior, 1994).

Os plasmídios ColV (pColV) são um grupo heterogêneo de grandes plasmídios que especificam a produção de colicina V. Smith (1974) observou que os plasmídios colicina V poderiam aumentar a invasibilidade, pois a eliminação dos mesmos reduzia a patogenicidade e sua reintrodução na bactéria restaurava a patogenicidade. Smith & Huggins (1976) encontraram correlação significativa entre a presença de pColV e a habilidade de *E. coli* em causar septicemia em galinhas e bezerros.

Nenhum efeito patogênico pode ser atribuído aos genes que codificam a colicina V. No entanto, várias propriedades fenotípicas que incluem resistência sérica (Binns et

al., 1979, Lior 1994), presença de antígeno capsular K1 (Montgomerie et al., 1984), produção de aerobactina (Williams & Warner, 1980), alteração na motilidade, mudanças em hidrofobicidade e de proteínas bacterianas de superfície, que facilitam a aderência às células do hospedeiro, ocorrem em alta proporção em amostras de *E. coli* pCol V positivas, isoladas de bacteremias (Lior, 1994). Por sua vez, Brennan et al. (1989) relacionam a colicina V à manutenção da população que alberga o pCol V, sendo um importante indicador da presença de plasmídios determinantes de virulência. Embora a expressão da colicina V não seja essencial para aumentar a virulência, mediada pelo plasmídio Col V, a colicina V pode atuar na manutenção da população que possui este plasmídio, sendo um importante indicador de sua presença (Brennan et al., 1989).

O gene estrutural do plasmídio colV é o *cvaC* porém, a liberação e exportação da colicina V é mediada por uma seqüência de sinais independentes que requer os produtos dos genes *cavA* e *cavB*: aminoácidos e proteínas (Gilson et al., 1987; Gilson et al., 1990). Em estudos com quelantes de ferro e mutantes foi constatado que a síntese da ColV é induzida sob condições de limitação de ferro (Waters & Crosa, 1991)

Ngeleka *et al* (1996) constataram a expressão de colicina V em 92% em amostras isoladas de celulite, Peighambari *et al* (1995) em 24,7% e Jeffrey et al. (1999) em 22%. Brito et al., (2003) verificaram a presença do gene *cvaC* em 48% das amostras de celulite e em 33% das amostras de fezes. Em amostras isoladas de aves com colisepticemia Blanco et al, (1997) relatam ocorrência em 22% das amostras, enquanto outros autores obtiveram percentuais mais altos. McPeake et al., (2005) demonstraram 99,1% de positividade e Rodriguez-Siek et al., (2005), 60,8%. Em amostras brasileiras o gene foi detectado em 35% delas (Delicato et al., 2003).

Provence & Curtiss (1994) relataram a ocorrência de atividade hemoaglutinante em amostras de *E. coli* que somente é expressa a temperaturas entre 26°C e 30°C e a chamaram de Hemaglutinina Temperatura Sensível e identificaram o primeiro gen (*tsh*). Este gen codifica uma proteína (Tsh) envolvida na proteólise de IgA humana e IgA de galinha (Stathopoulos et al., 1999). Sua participação na patogenicidade de amostras de origem aviária ainda necessita de mais estudos, entretanto vários autores relatam a maior ocorrência deste gen em amostras isoladas de aves doentes (Maurer et al., 1998). Brito et al (2003) obtiveram 19% de positividade em amostras de celulite, não tendo encontrado nenhuma amostra positivas entre as de fezes. Em amostras de colisepticemia Ewers et al, (2004) encontraram 53,3% enquanto outros autores relataram percentuais de 85,3% (Janben et al, 2001), 93,95% (McPeake et al, 2005) e 99% (Ngeleka et al., 2002). A resistência ao soro sangüíneo é um dos fatores freqüentemente associados à colibacilose (Brée et al., 1989; Vidoto et al., 1991; Wooley et al., 1992; 1993; Barnes & Gross, 1997; Parreira et al., 1998). Esta resistência ao soro foi definida por Taylor, (1983) como sendo a propriedade de uma amostra bacteriana, no início de sua fase logarítmica de crescimento, de ser totalmente insensível a uma alta concentração de soro. O estudo da resistência sérica, apresentada por bactérias Gram-negativas, tem sido impulsionado pela observação de que amostras septicêmicas e invasivas possuem maior resistência, quando comparadas a amostras não invasivas e não septicêmicas (Roantree & Rantz, 1960).

A capacidade do soro em provocar morte bacteriana é associada à presença de um conjunto de proteínas plasmáticas, denominado de sistema complemento. Este sistema é composto por aproximadamente trinta proteínas plasmáticas e de membrana celular do hospedeiro, que atuam na defesa contra infecções, agindo no sentido de eliminar os microrganismos invasores, liberando sub-componentes que atuam

efetivamente como mediadores na resposta inflamatória. A participação do sistema complemento nos mecanismos imunes de defesa é demonstrada pelo aumento da síntese dos componentes do complemento e pela diminuição da concentração de seus inibidores, quando o hospedeiro é acometido por infecções causadas por bactérias Gram-negativas. A ativação do sistema complemento nas reações bactericidas pode depender da formação do complexo antígeno-anticorpo na superfície da célula bacteriana ou próxima a ela, com ativação das moléculas do complemento, em cascata.

A resistência ao soro é mediada pelas superfícies estruturais polissacarídicas (LPS) da cápsula e de outras membranas protéicas, a presença de proteínas de membrana externa (Gross, 1994) e dos antígenos K1 e K5 codificados pelo gene *kps* (Johnson et al., 2005). A presença deste antígeno é freqüentemente associada a amostras septicêmicas isoladas de aves (Gross, 1994). Leive em 1965 estabeleceu uma relação entre a quantidade de LPS e o grau de resistência sérica encontrada demonstrando que o tratamento de amostras de *E. coli* com EDTA, para a remoção parcial do LPS presente na membrana externa, tornava essas amostras resistentes à ação do soro em amostras sensíveis. Delicato et al. (2002) obtiveram positividade de 20% em amostras isoladas de aves com colibacilose enquanto Brito et al., (2003) relataram 30% em cepas isoladas de celulite. Estes mesmos autores, analisando fezes de aves sadias obtiveram 8% e 0% de positividade, respectivamente.

A resistência sérica parece não estar associada à inibição do sistema complemento, como se supunha inicialmente, e sim à propriedade das amostras bacterianas resistentes de não permitirem uma inserção estável do complemento de ataque à membrana (Joiner et al., 1983). Goldman et al. (1984) encontraram, em amostras de *E. coli* O111, uma relação entre a resistência sérica e a quantidade de antígeno (Ag) O, que recobre o lipídeo A, impedindo a inserção do complexo de ataque

à membrana. O papel protetor do Ag O parece residir na propriedade da estrutura em manter o complexo citotóxico C5b6789(n) afastado da membrana externa (Joiner, 1988). Porém, grande parte dos sorogrupos de LPS não são suficientes no bloqueio da ação do sistema complemento, conforme demonstrada pela prevalência de determinados sorogrupos (Ag O) em infecções septicêmicas (Valvano, 1992). Alguns destes sorogrupos requerem a participação de outros fatores, como a presença de cápsula, para a expressão da resistência sérica (Cross et al., 1986). A variação do papel do Ag O em relação à resistência sérica pode refletir diferenças na sua composição química (Valvano, 1992). Outro fator de resistência sérica é a presença de proteínas de membrana externa de *E. coli*, sendo freqüentemente associadas à amostras septicêmicas isoladas de aves (Gross, 1994). Sua participação foi evidenciada inicialmente através da observação de que alguns plasmídios, como ColV-I-K94 (Williams, 1974; Binns, et al., 1979), R100 (Taylor, 1975) e R1 (Reynard & Beck, 1976), são capazes de transmitir a resistência sérica para células receptoras sensíveis. No plasmídio pColV-I-K94 foi identificado o gene *iss*, cuja proteína está relacionada com a inibição do complexo citotóxico (Binns et al., 1979), e não à formação deste complexo (Binns et al., 1982). Estudando amostras isoladas de celulite Ngeleka et al., (1996) verificaram que 71% das cepas expressaram resistência ao complemento enquanto as amostras estudadas por Gomis et al., (2000) apresentaram positividade de 88%. Brito et al., (2003) realizaram testes genéticos para a verificação da presença do gene *iss* obtendo 83% de positividade nas amostras isoladas de celulite enquanto todas as amostras de fezes foram negativas para a presença do gene. A presença do gene *iss* em amostras isoladas de aves com colisepticemia foi relatado por McPeake et al (2005) 72,8%, Pfaff et al (2000) 77%, Rodriguez-Siek et al (2005) 81,5% e Delicato et al (2003) 38,5%.

A propriedade de um patógeno invadir e se multiplicar é influenciada pela disponibilidade de ferro, essencial para o crescimento de todas as células vivas. A *E. coli* utiliza o ferro no transporte de oxigênio, síntese de DNA, transporte de elétrons e no metabolismo do peróxido (Neilands, 1981; Neilands et al., 1985)

Apesar do ferro ser encontrado em abundância nos tecidos e fluidos corporais a quantidade disponível é extremamente pequena. Nas condições fisiológicas ele se encontra ligado a glicoproteínas ou está em formas insolúveis. Para superar esta limitação a bactéria pode possuir sistemas especiais de assimilação, através dos quais ela capta o ferro necessário via componentes ligantes de ferro de baixo peso molecular chamados sideróforos (Neilands, 1981).

As *E. coli* podem efetuar o transporte deste mineral por meio dos sistemas ferricromo, citrato, enterobactina e aerobactina (Woodrow et al., 1978). A *E. coli* não produz os sistemas de alta afinidade ferricromo e citrato, entretanto quando estes sideróforos são liberados por outras bactérias presentes ela realiza estes transportes (Hante & Braun, 1975).

A aerobactina é um sideróforo de 565 kDa produzida por um operon biossintético que codifica enzimas da via metabólica. É sintetizada principalmente na fase exponencial tardia e na fase estacionária de crescimento (Stuart et al., 1980).

A forma de captação e transporte de ferro mais utilizado pela *E. coli* é a aerobactina. Este sideróforo é excretado ao meio e se liga ao íon férrico formando um complexo estável, através do qual o ferro é transportado para o citoplasma via componentes específicos das membranas externa e interna. É importante salientar que a aerobactina após cumprir sua função é reciclada continuamente no interior da célula e exportada para carrear outro íon ferro, o que implica em economia de energia (Braun, 2003; Rohrbach et al., 1995)

A presença de operon aerobactina é geralmente relacionada ao plasmídio ColV entretanto ele pode ser cromossomal (Johnson, 1991; Linggood et al., 1987). Os cinco genes da aerobactina estão arranjados em um único operon de 7,5Kb. Os genes da biossíntese são denominados *iucA*, *iucB*, *iucC* e *iucD*. O gene *iutA* codifica uma proteína receptora de membrana externa (Bindereif & Neilands, 1985).

Os genes da aerobactina têm sido encontrados em plasmídios que também codificam a resistência a certos antimicrobianos como os plasmídios R e em plasmídios ColV (Goes et al., 1993; Vidotto et al., 1991).

A aerobactina vem sendo utilizada como um importante marcador de virulência uma vez que os genes do pCol V no qual esta propriedade está codificada, também podem carrear outros fatores de virulência.

Amostras virulentas de *E. coli* normalmente apresentam maior porcentagem de positividade para aerobactina. Em amostras isoladas de celulite Ngeleka et al., (1996) encontraram 82% de positividade, Gomis et al., (2000) 44%, Gomis et al., (2001) 46,8%, Jeffrey et al., (2002), 92%. Brito et al., (2003) e Peighambari et al., (1995) estudaram amostras de celulite e de fezes. Nas amostras isoladas de celulite obtiveram 83% e 90% respectivamente. Nas de fezes, Brito et al., (2003) não constataram nenhuma amostra positiva e Peighambari et al., (1995) obteve somente 19% de positividade. Brito et al., (2003) analisaram ainda a presença do gene *iutA* e o constataram em 92% das amostras de celulite, mas, nenhuma amostra de fezes apresentou este gene. Gomis et al., (2001) estudando amostras de colisepticemia obtiveram positividade de 46,8%. Índices de 80,2% e de 63% foram obtidos por Rodriguez-Siek et al., (2005) e por Delicato et al., (2003), respectivamente. No entanto, Vandekerchove et al., (2005) apresentaram índice de 23%, bastante inferior aos demais.

Os avanços nas pesquisas e nas ferramentas utilizadas vêm resultando no maior entendimento dos mecanismos de patogenicidade e cada vez mais é demonstrada a grande importância da interação dos diversos fatores de virulência na determinação da patogenicidade. Entretanto, a diferenciação de cepas virulentas e avirulentas continua sendo um problema no diagnóstico e, por consequência, na tomada de decisão pelos veterinários de campo. Muito provavelmente, isto ainda acontece devido à complexidade das interações que existem entre os fatores de virulência das *E. coli* e ao fato dos procedimentos convencionais para a determinação da patogenicidade de *E. coli*, nos quais se inoculam animais, serem demorados, caros e eticamente questionados pela comunidade internacional. Além disto, na determinação do índice de patogenicidade "in vivo", não existe uma padronização de procedimentos e classificações o que impede a comparação dos resultados obtidos.

Na tentativa de resolver estes problemas Souza (2006) propôs uma classificação objetiva e com bases e resultados numéricos, com amplitude de 0 a 10, o que viabiliza a análise dos dados através de tratamento estatístico e que permite a comparação de resultados. Nesta nova metodologia não são levadas em consideração apenas as porcentagens de animais mortos. Ele contempla também o tempo da morte e as lesões apresentadas em cada um dos animais inoculados, o que o torna mais preciso. Nos cálculos deste índice foi acrescentada uma constante de 0,14, que foi denominada Fator de Bonificação de Sobrevivência (FBS), para ser subtraída do valor atribuído à morte da ave, para cada dia que ela sobrevivesse, no período de sete dias no qual os animais foram observados. Com esta nova alternativa, foi possível caracterizar os índices médios de patogenicidade de amostras isoladas nos aviários e estabelecer, com probabilidade estatística, se elas eram diferentes entre si, ou não.

Acreditamos que uma das ferramentas que tem potencial para resolver os problemas de ordem ética que envolve a utilização de animais e estabelecer um diagnóstico que inclua o índice de patogenicidade das *E. coli* seja a utilização de modelagens matemáticas, em especial as redes neurais artificiais.

As primeiras informações mencionadas sobre a neuro computação são de 1943, data em que McCulloch e Pitts publicaram Artigos sugerindo a construção de uma máquina baseada ou inspirada no cérebro humano.

Os modelos neurais procuram aproximar o processamento dos computadores ao do neurônio humano. As redes neurais possuem um grau de interconexão similar à estrutura do neurônio e em um computador convencional moderno a informação é transferida em tempos específicos dentro de um relacionamento com um sinal para sincronização. São capazes de lidar com tarefas complicadas, de forma dinâmica, sem que tenham que desenvolver um modelo matemático e nem um modelo do ambiente em que operam. A rede, diferentemente dos sistemas convencionais aprende, executa operações não lógicas, descobre as relações ou regras dos dados e exemplos e testa todas as possibilidades em paralelo (Tatibana & Kaetsu, 2004).

As redes neurais artificiais consistem em um método de solucionar problemas de inteligência artificial, construindo um sistema que tenha circuitos que simulem o neurônio humano, inclusive seu comportamento, ou seja, aprendendo, errando e fazendo descobertas. Mais que isso, são técnicas computacionais que apresentam um modelo inspirado na estrutura neural de organismos inteligentes e que adquirem conhecimento através da experiência. São interconectados por um conjunto de pesos o qual permite tanto o processamento serial quanto paralelo de informações através da rede (Astion & Wilding, 1992; Roush *et al.*, 1996).

A rede neural artificial é um sistema de "neurônios" ligados por conexões sinápticas e dividido em "neurônios" de entrada, que recebem estímulos do meio externo, "neurônios" internos ou ocultos e "neurônios" de saída, que se comunicam com o exterior. Os "neurônios" internos são de suma importância na rede neural, pois se provou que sem estes se torna impossível a resolução de problemas linearmente não separáveis. Em outras palavras, pode-se dizer que uma rede é composta por várias unidades de processamento, cujo funcionamento é bastante simples. Essas unidades, geralmente são conectadas por canais de comunicação que estão associados a determinado peso. As unidades fazem operações apenas sobre seus dados locais, que são entradas recebidas pelas suas conexões. O comportamento inteligente de uma Rede Neural Artificial vem das interações entre as unidades de processamento da rede. Estes fenômenos variáveis são conhecidos como causalmente dependentes, mas cuja dependência está além de uma simples relação linear ou não linear (Kovac's, 1996).

As redes neurais consistem em um método de solucionar problemas. A maioria dos modelos de redes neurais possui alguma regra de treinamento, onde os pesos de suas conexões são ajustados de acordo com os padrões apresentados. Em outras palavras, elas aprendem através de exemplos, de experiências. A rede neural passa por

um processo de treinamento a partir dos casos reais conhecidos. Sendo assim, a rede neural é capaz de extrair regras básicas a partir de dados reais. Arquiteturas neurais são tipicamente organizadas em camadas com unidades que podem estar conectadas às unidades da camada posterior. A medida que o aprendizado ocorre o erro entre a saída da rede e a saída desejada diminui. Usualmente as camadas são classificadas em três grupos: Camada de Entrada; onde os padrões são apresentados à rede; Camadas Intermediárias ou Ocultas; onde é feita a maior parte do processamento, através das conexões ponderadas; podem ser consideradas como extratoras de características; Camada de Saída: onde o resultado final é concluído e apresentado.

Entretanto, raramente revelam o conhecimento que está por trás de seu julgamento. Por esta razão é que são freqüentemente chamadas de “caixas pretas” (Forsström & Dalton, 1995).

A rede neural se baseia nos dados disponíveis para extrair um modelo geral. Portanto, a fase de aprendizado deve ser rigorosa e verdadeira, a fim de se evitar modelos falsos. Todo o conhecimento de uma rede neural está armazenado nas sinapses, ou seja, nos pesos atribuídos às conexões entre os "neurônios". De 50 a 90% do total de dados deve ser separado para o treinamento da rede neural, dados estes escolhidos aleatoriamente, a fim de que a rede "aprenda" as regras e não "decore" exemplos. O restante dos dados só é apresentado à rede neural na fase de testes a fim de que ela possa "deduzir" corretamente o inter-relacionamento entre os dados (Tatibana & Kaetsu, 2004).

As principais vantagens das análises com as redes neurais são que os cálculos são realizados por "neurônios" individuais, permitem a execução de análises mais complexas do que as executadas por técnicas de estatística convencional, a utilização de dados qualitativos e quantitativos no mesmo modelo, não requer a transformação de

dados, muitas vezes necessário para a estatística convencional e realizam análises de dados não lineares e multivariados, comuns em biologia.

As principais desvantagens das redes neurais incluem a não existência de regras que expressem o conhecimento aprendido ou uma equação e o maior número de dados que a estatística convencional.

Aplicações de redes neurais são inúmeras. Já são utilizadas com o objetivo de fazer prognóstico de mercados financeiros; reconhecer e gerar fala; localizar pontos de origem no radar, otimizar processos químicos; reconhecer alvos e detectar minas bélicas; identificar células cancerosas; reconhecer anormalidades cromossômicas; detectar fibrilação ventricular; prever trajetórias de entrada de naves espaciais; reconhecer automaticamente caracteres escritos à mão entre outros. Grupos de investimento também utilizam este tipo de rede para analisar pelo menos uma parte do mercado financeiro e fazerem suas seleções entre outras (Cheng & Titterton, 1994).

Outro exemplo da utilização de redes neurais para melhoria na tomada de decisões é no diagnóstico médico. Em seu aprendizado, são submetidos uma série de diagnósticos de pacientes de várias características, com vários sintomas e os resultados de seus testes. Também serão fornecidos os diagnósticos médicos para cada doença. Após esta fase de treinamento, quando forem apresentados os dados de um novo paciente, com seus sintomas, a rede fornecerá um diagnóstico para os novos casos. Isto essencialmente criará um sistema com o conhecimento de vários médicos, e fornecerá um diagnóstico inicial em tempo real (Tatibana & Kaetsu, 2004; Cross *et al.*, 1995).

Em 1994, Rivas afirmava que as bases e os fundamentos da modelagem matemática são, infelizmente, pouco conhecidas e pouco acessíveis aos profissionais não especializados, devido à escassez de livros texto e de Artigos de divulgação e, após dez anos, estes modelos ainda não são do domínio da comunidade científica sendo

pouco acessíveis aos profissionais da área biológica. Acreditamos que este fato pode dever-se a características dos próprios profissionais que normalmente não se sentem muito a vontade para trabalhar utilizando recursos matemáticos que estejam além da aplicação da estatística convencional. Benigni & Giuliani (1994) afirmaram que, concomitante a este problema, a biologia apresenta um grande número de peculiaridades que tornam difícil o uso imediato das mesmas ferramentas usadas em ciências exatas. A modelagem, através de leis naturais, típicas da física, é baseada em um número de exigências que raramente são satisfeitas em biologia. Os mesmos autores citam ainda fatores particularmente importantes para a utilização da metodologia destacando a prévia identificação dos objetos que tenham um papel no fenômeno sob estudo e a identificação das condições limitantes e do domínio da aplicabilidade do modelo.

A utilização de redes neurais na área biológica é bastante recente e os primeiros trabalhos foram publicados em 1991. Na área avícola os primeiros modelos utilizando redes foram publicados por Zhang et al. (1996) e Efadil et al. (1996). No Brasil as primeiras pesquisas onde foram utilizadas modelagens matemáticas, nesta área, foram publicadas por Salle et al. (1998) propondo a criação de um critério de interpretação para os resultados sorológicos gerados pelas empresas avícolas através de modelos matemáticos estatísticos. Foram ajustadas equações de regressão que descreviam a relação entre a idade das aves e os títulos de anticorpos apresentados pelas aves para as doenças de Newcastle, Gumboro e bronquite infecciosa nos anos de 1993 a 1995, através das análises de regressão lineares e não lineares. Em outra linha de pesquisa do grupo, as micotoxinas, também existia a necessidade de respostas que a estatística convencional não estava atendendo. Os modelos matemáticos foram então utilizados para correlacionar a presença de aflatoxina e ocratoxina em alimento e em vísceras de

frangos de corte com os parâmetros produtivos do lote (Salle et al., 1999). Com estes trabalhos, que comprovam a utilidade dos modelos matemáticos na área avícola iniciou-se a busca de metodologia capaz de solucionar problemas mais complexos. Em 2001, Salle et al. publicam o primeiro trabalho utilizando a tecnologia das redes neurais artificiais onde foram estimados os parâmetros de produção de galinhas reprodutoras pesadas em recria. Em 2004, foi defendida por Reali uma dissertação de mestrado onde com a utilização das redes neurais artificiais foram estimados os parâmetros de produção de frangos de corte. Em 2005 em uma nova dissertação de mestrado Felipe Salle utilizou esta ferramenta na análise de parâmetros do incubatório.

Felizmente as publicações com a utilização desta nova tecnologia na área da biologia vêm crescendo a cada ano. Em recente pesquisa bibliográfica localizamos 187 trabalhos na área de bacteriologia que utilizaram redes neurais. Destes, 46 trabalharam com *E. coli*, seis com *Salmonella* e quatro com várias espécies de *Haemophilus*. Outros microrganismos como *Mycobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* entre outros já começam a ser estudados utilizando este poderoso recurso. Entretanto nenhum dos trabalhos encontrados faz menção a amostras de origem avícola.

Os trabalhos com *E. coli* tratam essencialmente de bases genéticas (Mosier et al., 2003; Juncker et al., 2003; Kanaya et al., 2001; Carson et al., 1995; O'Neill, 1992; Demeler & Zhou, 1991) expressão bioquímica (Coleman, 2003; Hajmeer & Basheer, 2002; Hajmeer & Basheer, 2003) entre outras.

Demeler & Zhou, 1991 criaram e testaram modelos para a identificação de promotores do RNA polimerase de *E. coli* e obtiveram resultado de 100% de acerto em relação aos reais promotores e 98,4% no teste ao acaso.

Kanaya *et al* (2001) trabalhando com seqüência de DNA utilizaram as redes para organizar e compreender os códons de 29 espécies de bactérias simultaneamente, incluindo a *E. Coli*.

Predições de lipoproteína de bactérias Gram-negativas foram realizadas por Agnieszka (2003). O modelo distinguiu as lipoproteínas SPaseII, SpaseI, membranas citoplasmáticas e proteínas de membrana. A predição foi exata em 96,8% das vezes.

Carson em 1995 comparou a técnica convencional de leitura da técnica de “pulsed-field” (PFGE), através de análise visual de dois técnicos, com a análise das imagens capturadas e analisadas através das redes neurais. Os resultados demonstraram que as redes neurais foram mais eficientes. As redes classificaram corretamente 90 das 99 amostras de *E coli* O157: H7 e 90 das 99 amostras não O157: H7 foram identificadas acertadamente, com o programa ocorreram 3% de falsos negativos e 9% de falsos positivos. O que representa 97% de sensibilidade com as O157: H7 e 91% de especificidade com as não O157: H7. A sensibilidade com a leitura do primeiro técnico foi de 78% e especificidade de 91,9. Com o segundo técnico a sensibilidade foi de 89% e a especificidade de 77%. A diferença estatística entre as técnicas foi significativa.

Ramos-Nino et al. (1998) estudaram a atividade de uma série de benzaldeídos sobre a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Lactobacillus plantarum* e estabeleceram a sensibilidade dos microrganismos citados frente a estes agentes químicos. A sensibilidade da *Salmonella* foi maior que a da *Listeria* que se mostrou maior que a do *Lactobacillus*.

Kennedy & Thakur (1993) utilizando redes neurais avaliaram a possibilidade de realizar a classificação e identificação de microrganismos e classificaram 13 espécies de *Haemophilus* com esta ferramenta.

Mosier *et al.* (2003) realizando predições de mutagenicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade de derivados de tiophene obtiveram predições entre 80 e 85%. Classificações estas consideradas muito boas.

O'Neill (1992), estudando diferentes classes de promotores (seqüências de DNA), com várias funções na *E. coli*, relataram nível de acertos entre 63 e 82%, afirmando que os modelos gerados demonstram um nível muito alto de descoberta de promotores. Para chegar a estes resultados foram treinadas mais de 100 redes.

Vale ressaltar que nos trabalhos de Mosier *et al.* (2003) e O'Neill (1992) existem um maior número de interações e complexidade entre as variáveis analisadas, se comparados ao exemplos anteriormente citados.

Citamos apenas alguns exemplos que demonstram ser viável a utilização das redes neurais artificiais para análise de questões relacionadas à bacteriologia. Entretanto, nenhum dos aqui citados ou outros disponíveis na literatura consultada relata a utilização das redes neurais artificiais para a classificação da *E. coli* relacionando os seus fatores de virulência ao índice de patogenicidade, objetivo deste trabalho. É importante ressaltar que com a utilização das redes neurais artificiais o que se pretende é implementar uma ferramenta de auxílio à tomada de decisões, e não um programa que substitua o conhecimento científico e técnico.

## 6. TRABALHOS CIENTÍFICOS

### 6.1. Artigo 1

AVIAN DISEASES 46:749–753, 2002

#### *Case Report*—

### **Virulence Factors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Broilers from the South of Brazil**

Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha,<sup>A</sup> Ari Bernardes da Silva,<sup>A</sup>  
Benito Guimarães de Brito,<sup>B</sup> Hamilton Luiz de Souza Moraes,<sup>A</sup>  
Alexandre Pontes Pontes,<sup>A</sup> Milene Cristine Cé,<sup>A</sup> Vladimir Pinheiro do Nascimento,<sup>A</sup>  
and Carlos Tadeu Pippi Salle<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Av. Bento Gonçalves, 8824, Porto Alegre, 91540-000, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>B</sup>Universidade Estadual de Londrina, Centro de Investigação em Medicina Aviária do Paraná, Caixa postal:6001, Londrina, 86051-990, Paraná, Brazil

Received 31 October 2001

**SUMMARY.** Sixty-three *Escherichia coli* strains isolated from broilers with respiratory problems were examined for virulence factors, hemolysin synthesis ability, motility, hemagglutination capacity, operon *pap* presence, colicin production, and serum resistance. The capacity to hemagglutinate guinea pig erythrocytes was found in 53 (84.1%) of the samples, but only 30 (47.6%) agglutinated chicken erythrocytes. D-mannose-sensitive hemagglutination against guinea pig erythrocytes was found in 19 (30.2%) samples and against chicken erythrocytes, in 15 (23.8%) samples, whereas the D-mannose-resistant hemagglutination with guinea pig erythrocytes was found in 34 (54%) samples, and 13 of these (20.6%) showed this characteristic against chicken erythrocytes. Operon *pap*, P fimbria codifier, was detected in 26 samples in a total of 34 D-mannose-resistant samples. Colicin production was observed in 55 (87.3%) of the strains, and 41.8% presented V colicin production. Of the samples analyzed, 56 (88.9%) presented serum resistance, six (9.5%) were intermediate, and only one (1.6%) was sensitive to the action of the complement. The diversity of virulence profiles detected in the samples in this study explains in part the multifactorial characteristics of avian colibacillosis.

**RESUMEN.** *Reporte de Caso*—Factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* patógenas para pollos de engorde aisladas en el Sur de Brasil.

Se analizaron 63 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pollos de engorde que padecían problemas respiratorios. Las cepas fueron estudiadas de acuerdo con factores de virulencia como capacidad para sintetizar hemolisina, motilidad, capacidad para hemoaglutinar, presencia del operon *pap*, producción de colicina y resistencia al suero. Se demostró la capacidad para hemoaglutinar eritrocitos de cobayo en 53 de las muestras (84.1%), pero solo 30 (47.6%) aglutinaron eritrocitos de pollo. En 15 muestras (23.8%) se encontró aglutinación de eritrocitos de cobayo, la cual fue sensible a la D-manosa, mientras que se encontró hemoaglutinación resistente a la D-manosa en 34 muestras (54%) y 13 de éstas (20.6%) mostraron la misma característica contra eritrocitos de pollo. Se detectó el operon *pap* codificante de la fimbria P en 26 de un total de 34 muestras resistentes a la D-manosa. Se observó producción de colicina en 55 muestras (87.3%) de las cepas y 41.8% presentaron producción de colicina V. Del total analizado, 56 muestras (88.9%) presentaron resistencia al suero, seis (9.5%) presentaron una resistencia intermedia y solo una muestra (1.6%) fue sensible a la acción del complemento. La diversidad de los perfiles detectados en las muestras de este estudio explica en parte las características multifactoriales de la colibacilosis aviar.

Key words: *E. coli*, virulence factors, avian colibacillosis

Abbreviation: PCR = polymerase chain reaction

*Escherichia coli* is regarded as a member of the normal intestinal tract flora of animals, but some strains are pathogenic because of the acquisition of virulence factors (26). Avian pathogenic *E. coli* causes a variety of disease manifestation in poultry, including respiratory tract infection, yolk sac infection, swollen head syndrome, polyserositis, septicemia, and cellulitis (3).

Several bacterial properties, including motility (2) and type 1 and P pili, have been associated with virulence (10,27). The existence of pilus adherence in these pathogenic strains facilitates colonization of the avian respiratory tract, an event that seems to be a prerequisite for the expression of virulence (8). Type 1 fimbriae cause mannose-sensitive hemagglutination and are characterized by their ability to agglutinate guinea pig erythrocytes in the absence of mannose; the type 1 fimbriae are coded by the *pil* operon (13). P fimbriae cause mannose-resistant hemagglutination and are coded by the *pap* operon (19).

Serum resistance, which may often be mediated by the presence of the capsular antigen, lipopolysaccharide, and certain outer membrane proteins, appears to correlate with virulence in most strains (27). Virulent strains are capable of persisting in the intestinal tract longer and in greater numbers than avirulent ones; this may be related to colicin production by *E. coli*.

*Escherichia coli* has evolved two mechanisms of acquiring and assimilating iron from its host. These include the production of iron-chelating compounds, known as siderophores, and the production of hemolysins (11). The genes encoding the hemolysin and aerobactin system have been associated with virulence (7,23).

The objective of this study was to characterize virulence factors of 63 *E. coli* strains isolated from chickens with respiratory infection in the south of Brazil. This information will be useful when selecting *E. coli* strains suitable for use in the development of a vaccine that will be effective in the control of chicken colibacillosis.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** Sixty-three *E. coli* strains were isolated from different colibacillosis outbreaks in chickens that occurred in Rio Grande do Sul, Brazil.

This state is among the most representative in terms of commercial chicken production in Brazil.

**Motility.** *Escherichia coli* strains were tested for motility after stab inoculations into motility media. Tubes were incubated at 37 C and examined after 24 and 48 hr for evidence of motility (2).

**Hemagglutination assays.** Bacteria were grown in colonization factor antigen agar at 37 C for 18 hr. The starting concentration of the cells was  $10^{10}$ /ml. Hemagglutination activity (HA<sup>+</sup> phenotype) was determined by the microhemagglutination test (15) with 96-well round-bottom plates and fresh erythrocytes from guinea pig and chickens, either in the presence or absence of added 1.0% D-mannose.

**Hemolytic activity.** The production of hemolysin was tested on sheep blood agar plates. Strains having a clear halo after overnight culture at 37 C were defined as hemolytic (17).

**Colicin detection.** Colicin production was evaluated by the agar overlay method (26). These strains were cultured in tryptic soy broth at 37 C overnight and plated onto tryptic soy agar. The colonies obtained after incubation at 37 C overnight were killed with chloroform and overlaid with 3 ml of soft tryptic soy agar containing colicin indicator strains (*E. coli* K12 RCW, col Ia, col Ib, col E<sub>1</sub>, col E<sub>2</sub>, col E<sub>3</sub>, col K, col B, and col V). After overnight incubation at 37 C, the capacity for colicin production was detected by the presence of a halo around the producer colonies.

**Polymerase chain reaction (PCR).** All *E. coli* were examined for the presence of gene coding for P fimbriae production by PCR. The bacterial DNA to be amplified was released from whole organisms by boiling, and the oligonucleotides used as primers (5' to 3') were ECFP1: GAC GGC TGT ACT GCA GGG TGT GGC G, ECFP2: ATA TCC TTT CTG CAG GGA TGC AAT A (16).

PCR was carried out in a total volume of 25 µl containing 5 µl of template DNA, each of the primers at 20 pmol, the four deoxynucleoside triphosphates (each at 200 µM), PCR buffer, and 1.5 U of Taq DNA polymerase. PCR amplifications consisted of 30 cycles of 94 C for 1 min, 65 C for 1 min, and 72 C for 2 min in a thermal cycler (GeneAmp PCR System 2400; Perkin Elmer, Norwalk, CT). The amplified DNA was visualized in 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide. Positive control strains were UPEC-BK 01 (5).

**Serum resistance.** The determination of bacterial resistance to the lethal activity of serum was tested by a rapid micromethod (21). Serum obtained from healthy rabbits was used at a concentration of 20%. Optical density readings were made in a microplate reader with 650- and 490-nm filters at times of 0, 30, 60, and 90 min. In the interpretation of the result, the mean of the absolute optical densities obtained was transformed in relative density for each

time, compared with time zero, which permitted the type of growth curve to be visualized. For the effective classification of the samples, the means of the readings obtained at the times 0 and 90 min were analyzed statistically by the Student *t*-test for paired samples. This procedure was carried out individually for each one of the samples and for each filter used. The samples presenting statistically significant growth were considered positive. Similarly, those presenting statistically significant decrease were considered negative. The samples where the test showed nonsignificant growth or decrease were classified as intermediate. The significance index used was 95%.

### RESULTS AND DISCUSSION

The role of hemolysin in *E. coli* infections is still debatable. However, many studies show a greater frequency of hemolytic strains isolated from extraintestinal infections in humans, swine, sheep, and cattle (4,5,6). Only strains that did not produce hemolysis have been found in samples isolated from poultry with colisepticemia or from the intestines of normal poultry (11,26). None of the samples analyzed in this study produced hemolysis in agar blood; therefore, the results found in the present investigation were in line with those reported by several researchers (7,11,26).

The importance of motility as an avirulence factor has obtained contrary results among authors. Wooley *et al.* (27) reported an important difference, having found motility in 100% of the strains isolated from chickens with colisepticemia, whereas those detected in normal poultry presented this characteristic on only 55% of the occasions. Rosenberger *et al.* (22) reported that motility is not related to the increase in pathogenicity, and Parreira *et al.* (20) informed that in their studies motility was negatively associated with other studied virulence factors. In the present study, 35 (55.5%) of the samples analyzed were motile.

The hypothesis that in poultry infections by *E. coli* begin in the upper respiratory tract makes the adherent fimbriae a fundamental factor for the occurrence of natural infection (9). In the present study, 53 samples (84.1%) expressed fimbriae in the hemagglutination test in at least two types of erythrocytes used. These results are in line with those reported by several authors (12,26,27), who stated that isolated samples of poultry with colisepticemia very frequently present fimbriae.

D-mannose hemagglutination sensitive to guinea pig erythrocytes, which indicates the presence of type 1 fimbriae, was shown in 19 samples (30.2%) representing 35% of the total of hemagglutinated samples. Vidotto *et al.* (26), who obtained a superior result when analyzing samples isolated from poultry with airsacculitis, detected that 61.3% presented D-mannose-sensitive hemagglutination. The lower percentage of D-mannose-sensitive samples in this study may be due to the fact that 31 (54%) had expressed resistant D-mannose fimbriae, including 26 samples (41.2%) with the presence of the fimbriae P, *pap* coding gene, which may have impeded the visualization of the expression of sensitive D-mannose fimbriae. This hypothesis is based on studies by several authors (24,25), who found the expression of more than one type of fimbria in the same sample in many cases of colisepticemia in poultry. Other authors (1,14) also found this fact in samples that, besides expressing type I fimbria, expressed several P fimbriae, serologically distinct P fimbriae, and with different molecular characteristics.

Fifty-five (87.3%) of the samples analyzed produced some type of colicin. This result is superior to that described by several researchers (11,12,26,27). Colicin V was produced by 23 samples (36.5%) (Table 1), a result comparable with that reported by other authors (11). Colicin V activity cannot be considered responsible for the virulence in *E. coli* only because it is constantly associated with plasmids that carry genes for several virulence factors (18). The colicin E3 in this study was produced by 15 samples (23.8%) of the total studied: the Ia by 7 (11.1%), E2 by 7 (11.1%), B by 4 (6.3%), Ib by 3 (4.8%), and K in only one (1.6%). E1 colicin was not produced by any of the samples analyzed. These results differ from those reported by other researchers (20,26), where none of the samples studied produced the colicins mentioned previously. Unclassified colicins, different from those quoted above, were produced by 17 (27.0%) of the 63 samples, and in eight samples (12.7%), there was no colicin production. Thirteen (20.6%) of the samples analyzed did not show production of more than one type of colicin. A similar result was obtained by Parreira *et al.* (20), who found simultaneous production of more than one colicin in 12.8% of the samples studied. The present study found eight different association profiles of colicin

Table 1. Virulence factors (hemagglutinating activity, P fimbriae, colicin V, and serum resistance) of *E. coli* strains isolated from chickens with colisepticemia.<sup>A</sup>

Strain	HA	P fimbriae	Colicin V	Serum resistance
01	MS	-	+	-
02	MS	-	-	i
03, 04, 20, 25, 27, 50, 52, 53, 55, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67	MR	+	-	+
05, 23, 24, 39, 40, 58, 60, 65	MR	+	+	+
06, 13, 14, 19, 21, 33, 34, 37, 38, 41	MS	-	-	+
07, 22, 26	NH	-	+	+
08, 31, 36, 43, 46, 49, 51	NH	-	-	+
09, 10, 15	MS	-	+	i
11	MR	-	+	i
12, 32, 45, 47	MS	-	+	+
28, 42, 44, 48, 63	MR	-	-	+
29, 35	MR	-	+	+
54, 56	MR	+	-	-

<sup>A</sup>HA = hemagglutination erythrocytes from guinea pig; MS = mannose sensitive; MR = mannose resistant; NH = no hemagglutination; + = positive; - = negative; i = intermediate serum resistance.

production association where two samples (3.2%) produced colicins V, Ia, and E2; one sample (1.6%) produced the V, Ia, and B colicins; two samples (3.2%) produced V and Ib; one sample (1.6%) produced V, Ib, E2, and B; one sample (1.6%) produced V and B; one sample (1.6%) produced V and E2; one sample (1.6%) produced E2, B, and K; and four samples (6.3%) produced V and Ia. The latter profile was also reported as present in 10.2% of samples analyzed by Parreira *et al.* (20).

Resistance to blood serum may be an important factor for the development of avian colisepticemia because of the ability it provides the microorganism to survive the action of the complement (26,27). Fifty-six (88.9%) of the 63 samples analyzed presented serum resistance (Table 1). The results of this study are similar to those obtained by other researchers (12,20). In the present study, six samples (9.5%) were classified as intermediate. Vidotto *et al.* (26) obtained 13.3%. Wooley *et al.* (27) found 32.5% in samples of poultry with colisepticemia. Only one sample was sensitive to rabbit serum. There was no disagreement for sample classification (resistant, intermediate, and sensitive) among the results obtained from the two filters used to read the optical density. Note that none of the authors previously mentioned in their studies the criteria adopted for filter choice for use in the optical density reading, and a great diversity in the wavelengths was found.

Another situation to be emphasized is the final classification of the samples as positive, intermediate, and negative by other authors (26,27), but they do not state the criteria they used. With this procedure, with 95% statistical significance, it was possible to establish a classification method with objective criteria, which will be useful in future experiments that aim to characterize the serum resistance of *E. coli* samples.

In conclusion, these results suggest that the diversity of pathotypes detected partially explains the multifactorial nature of avian colibacillosis. In view of the large number of pathotypes observed in our strains, an effective vaccine will need to contain a number of strains of different pathotypes.

## REFERENCES

1. Abe, C., S. Schimitz, I. Moser, G. Boulnois, N. High, I. Ørskov, F. Ørskov, B. Jann, and K. Jann. Monoclonal antibodies with fimbrial F1C, F12, F13 and F14 specificities obtained with fimbrial from *Escherichia coli* O4:K12:H-. *Microb. Pathog.* 2:71-77. 1987.
2. Arp, L. H., and A. E. Jensen. Piliation, hemagglutination, motility and generation time of *Escherichia coli* that are virulent or avirulent of turkeys. *Avian Dis.* 24:153-161. 1980.
3. Barnes, H. J., and W. B. Gross. Colibacillosis. In: *Diseases of poultry*, 10th ed. B. W. Calnek, ed.

- Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 131–141. 1997.
4. Beutin, L. The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol.* 180:167–182. 1991.
  5. Brito, B. G., D. S. Leite, R. E. Linhares, and M. C. Vidotto. Virulence-associated factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Vet. Microbiol.* 65:123–132. 1999.
  6. Cavalieri, S. J., G. A. Bonach, and I. Snyder. *Escherichia coli* alfa-haemolysin: characteristics and probable role pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 48:326–343. 1984.
  7. Caya, F., J. M. Fairbrother, L. Lessard, and S. Quessy. Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *J. Food Prot.* 62:741–746. 1999.
  8. Dho, M., and J. P. Lafont. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. *Avian Dis.* 26:787–797. 1982.
  9. Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299–316. 1999.
  10. Dozois, C. M., S. A. Pourbakhsh, and J. M. Fairbrother. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet. Microbiol.* 45:297–309. 1995.
  11. Emery, D. A., K. V. Nagajara, D. P. Shaw, J. A. Newman, and D. G. White. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis.* 36:504–511. 1992.
  12. Fantinatti, F., Silveira, W. D., and A. F. P. Castro. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemic *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* 41:75–86. 1994.
  13. Hull, R. A., R. E. Gill, P. Hsu, B. H. Minshew, and S. Falkow. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect. Immun.* 33:933–938. 1981.
  14. Jann, K., B. Jann, and G. Schmidt. SDS polyacrylamide gel electrophoresis and serological analysis of pili from *Escherichia coli* of different pathogenic origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 11:21–25. 1981.
  15. Jones, G. W., and J. M. Rutter. The association of K88 antigen with haemagglutinating activity in porcine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 84:135–144. 1974.
  16. Le Bouguenec, C. L., M. Archambaud, and A. Labigne. A rapid and specific detection of the pap, afa and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:1189–1193. 1992.
  17. Mackman, N., and P. H. Williams. Detection of  $\alpha$ -haemolysin production by clinical isolates of *Escherichia coli*. In: *The virulence of Escherichia coli*. M. Sussman, ed. Academic Press, London, United Kingdom. pp. 425–427. 1985.
  18. Milch, H., S. Nikolnikov, and E. Czirox. *Escherichia coli* Col V plasmids and their role in pathogenicity. *Acta Microbiol. Hung.* 31:117–125. 1984.
  19. Normark, S., D. Lark, and R. Hull. Genetics of digalactoside-binding adhesin from a uropathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* 41:942–949. 1983.
  20. Parreira, V. R., C. W. Arns, and T. Yano. Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome. *Avian Pathol.* 27:148–154. 1998.
  21. Pelkonen, S., and J. Finne. A rapid turbidimetric assay for the study of serum sensitivity of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 42:53–57. 1987.
  22. Rosenberger, J. K., P. A. Fries, S. S. Cloud, and R. A. Wilson. In vivo and in vitro characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity. *Avian Dis.* 29:1095–1107. 1985.
  23. Smith, H. W., and M. B. Huggins. The toxic role of alpha-haemolysin in the pathogenesis of experimental *Escherichia coli* infection in mice. *J. Gen. Microbiol.* 131:395–403. 1985.
  24. Suwanichkul, A., and B. Panigrahy. Diversity of pilus subunits of *Escherichia coli* isolated from avian species. *Avian Dis.* 32:822–825. 1988.
  25. Suwanichkul, A., B. Panigrahy, and R. M. Wagner. Antigenic relatedness and partial amino acid sequences of pili of *Escherichia coli* serotypes O1, O2, and O78 pathogenic of poultry. *Avian Dis.* 31:809–813. 1987.
  26. Vidotto, M. C., E. E. Muller, J. C. Freitas, A. A. Alfieri, I. G. Guimarães, and D. S. Santos. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 34:531–538. 1990.
  27. Wooley, R. E., K. R. Spears, J. Brown, L. K. Nolan, and O. J. Fletcher. Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 36:679–684. 1992.

#### ACKNOWLEDGMENT

This study was financed by the Associação Gaúcha de Avicultura.

## 6.2. Artigo 2

### **Genetic Profile of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from poultry respiratory cases**

Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha<sup>1,2\*</sup>; Silvio Luis da Silveira Rocha<sup>2</sup>, Carlos André da Veiga Lima Rosa<sup>3</sup>, Guilherme Fonseca de Souza<sup>2</sup>, Hamilton Luiz de Souza Moraes<sup>2</sup>, Felipe de Oliveira Salle<sup>2</sup>, Lucas Brunelli de Moraes<sup>2</sup>, Carlos Tadeu Pippi Salle<sup>2</sup>

**Abstract:** Rocha A.C.G.P, Salle C.T.P., Rocha S.L.S., Lima-Rosa C.A.V., Souza G.F., Moraes H.L.S., Salle F.O., Moraes L.B. 2006. [**Genetic Profile of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry**]. Pesquisa Veterinária Brasileira

Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Av Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: [ana.crocha@terra.com.br](mailto:ana.crocha@terra.com.br)

**ABSTRACT:** Genetic Profile of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry.) The virulence mechanisms of avian pathogenic E.coli (APEC) have been continually studied and they are believed to be multi-factorial. Certain properties are primarily associated to virulent samples and have been identified in avian isolates. In this study a total of 61 *Escherichia coli*, isolates from chicken flocks presenting respiratory symptomatology probed by Polymerase Chain Reaction (PCR) for the presence of genes responsible for the adhesion capacity, P fimbria (*papC*) e F11 fimbria (*felA*), colicin production (*cvaC*), aerobactin presence (*iutA*), serum resistance (*iss*), temperature-sensitive hemmagglutinin (*tsh*) and presence of K1 and K5 capsular antigens (*kpsII*). The *iss* gene was detected in 73,8%, *tsh* in 55,7%, *iutA* in 45,9%, *felA* in 39,3%, *papC* in 24,3%, *cvaC* in 23% and *kpsII* in 18%.

INDEX TERM: *Escherichia coli*, virulence, PCR, poultry, pathogenicity.

<sup>1</sup> Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório DNA, Departamento de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Brasil

**Resumo.- [Perfil Genético de *Escherichia coli* Patogênica para Aves (APEC) isoladas de frangos de corte com sintomatologia clínica respiratória.]**Os

mecanismos de virulência das amostras de *E. coli* potencialmente patogênicas para aves (APEC), tem sido continuamente estudados e acredita-se ser multifatorial. Certas propriedades são associadas primariamente a amostras virulentas e vêm sendo identificados em amostras de *E. coli* isoladas de aves. Neste estudo um total de 61 amostras de *Escherichia coli*, isoladas de frangos de corte com problemas respiratórios foram testadas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a presença dos genes responsáveis pela capacidade de adesão, fimbria P (*papC*) e fimbria F11 (*felA*), produção de colicinas (*cvaC*), presença de aerobactina (*iutA*), resistência sérica (*iss*), hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) e presença de dos antígenos capsulares K1 e K5 (*kpsII*). O gene *iss* foi detectado em 73,8%, *tsh* em 55,7%, *iutA* em 45,9%, *felA* em 39,3%, *papC* em 24,6%, *cvaC* em 23% e *kpsII* em 18%.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Escherichia coli*, virulência, PCR, patogenicidade, frango de corte.

## INTRODUCTION

The increasing competition in meat markets gives rise to the necessity of more and more efficient and competitive production. In this scenario, production rates are fundamental to surveillance and competitiveness of poultry processing plants. These rates comprise fundamentally the sanitary aspects of the breeding stock.

*Escherichia coli* (*E. coli*), which is part of birds normal microbiota (Bettelheim, 1994) in intestinal and respiratory tracts (Morris & Sojka, 1985), was forgotten as a potential pathogen. However, lesions in which *E. coli* is the primary and mainly the secondary agent produce economic damage due to lower corporal development, insufficient feed conversion, increasing mortality, higher cost with medicine and condemnation of carcasses.

In Brazil, from 2001 to 2005, the partial or total condemnation carcasses because of the presence of lesions, in which *E. coli* may be the responsible agent, caused losses estimated at 58 million dollars, from which 39 million were caused by systemic lesions (Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária and Abastecimento, 2006).

Considering that 10-15% of *E. coli* samples can be potentially pathogenic (Barnes & Gross, 1997), the knowledge of the interaction of factors connected to handling, nutrition, genetics of the birds, immunodepression occurrence and especially the bacterial genetics turned urgent and decisive in the occurrence of the disease.

The virulence mechanisms of avian pathogenic *E. coli* (APEC) have been continuously studied and they are believed to be multi-factorial. Certain properties are primarily associated to virulent samples and have been identified in avian isolates. The most frequently mentioned are: the adhesion capacity (*pap and fel*), the colicin production (*cva*), the aerobactin presence (*iut*), the seric resistance (*iss*) (Barnes, 1997),

hemmagglutinin sensitive temperature (*tsh*) and the presence certain capsular antigens (*kps*) (La Ragione & Woodward, 2002).

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial samples:** Sixty one (61) *E. coli* isolates from 58 chicken flocks presenting respiratory symptomatology and at the necropsy lesions compatible with colibacillosis. The samples were stored in BHI (Brain Heart Infusion/ Oxoid, England) with glycerol at 30% in freezer at -20°C.

**Motility:** The samples' motility was verified by the use SIM Medium (Sulfuric acid indol motility/Merck, Germany).

**Virulence genes:** *E. coli* was probed by the Polimerase Chain Reaction (PCR) for the presence of genes responsible for the adhesion capacity, P fimbriae (*papC*) and F11 fimbriae (*felA*), colicin production (*cvaC*), aerobactin presence (*iutA*), serum resistance (*iss*), temperature-sensitive hemmagglutinin (*Tsh*) and presence of K1 and K5 capsular antigens (*kpsII*).

### PCR:

#### Extraction of the DNA:

One mL of suspension was collected from a bacterial culture in BHI of 24h at 37°C. This volume was centrifugated for 5 minutes. The supernatant was rejected and 800µl of the miliQ was added. After having been homogenized, the samples were submitted to a new centrifugation in the same conditions previously mentioned. The supernatant was rejected and 80µl of water miliQ water was added. Then the samples were submitted to a temperature of 96°C for 10 minutes in waterbath. The supernatant was removed and maintained frozen until the moment of the analysis.

**Mix:** For the genes *iutA* and *cvaC* it was used 11.2µl of miliQ water, 2.5µl of PCR buffer 10X (Lab Trad, Brazil), 2µl of dNTP mix with 2.5 mM of each nucleotide (Invitrogen Life Technologies, USA), 2µl of 50mM MgCl<sub>2</sub>, 1µl of 20pM each primers (Invitrogen Life Technologies, USA), 0.3µl of 5U Taq DNA polymerase (Lab Trad., Brazil) and 5µl of template DNA.

For the genes *felA*, *kpsII*, *papC*, *tsh* and *iss* it was used 11.95µl of miliQ water, 2.5µl of PCR buffer 10X (Lab Trad, Brazil), 2µl of dNTP mix with 2.5 mM of each nucleotide (Invitrogen Life Technologies, USA), 1.25µl of 50mM MgCl<sub>2</sub> (Lab Trad, Brazil), 1µl of 20pM each primers (Invitrogen Life Technologies, USA), 0.3µl of 5U Taq DNA polymerase (Lab Trad., Brazil) and 5µl of template DNA.

The primers were reported in Table 1.

**Amplification:** The conditions of PCR, the sequence of the primers and the size of the amplified fragment for each studied gene are described in Table 1. The tests were done in thermal cycler PCT-100 (MJ Research) and the amplified DNA was visualized in agarose gel at 1.2% (Invitrogen Life Technologies, USA) contains ethidium bromide (Sigma, USA).

**Reference *E. coli* strains:** BK 324 (*cvaC*, *iss*, *felA*, *papC*, *tsh*), IAPAR 1315 (*iutA*) e ATCC 35278 (*kpsII*).

**Table 1. Sequence of the primers, size of amplified fragments and conditions used in PCR for the detection of the genes associated to the virulence.**

Gene	Primer Sequence 5' – 3'	Fragment Size (bp)	PCR conditions
<i>kpsII</i>	gcg cat ttg ctg ata ctg ttg cat cca gac gat aag cat gag ca	272	5 min 94°C / 30 ciclos 1 min 94°C, 1 min 63°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>cvaC</i>	cac aca caa acg gga gct gtt ctt ccc gca gca tag ttc cat	680	5 min 94°C / 30 ciclos 1 min 94°C, 1 min 63°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>papC</i>	gac ggc tgt act gca ggg tgt ggc g ata tcc ttt ctg cag gga tgc aat a	328	5 min 94°C / 30 ciclos 1 min 94°C, 1 min 63°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>felA</i>	ggc agt ggt gtc ttt tgg tg ggc cca gta aaa gat aat tga acc	270	5 min 94°C / 35 ciclos 1 min 94°C, 1 min 63°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>iutA</i>	ggc tgg aca tca tgg gaa ctg g cgt cgg gaa cgg gta gaa tcg	300	5 min 94°C / 35 ciclos 1 min 94°C, 1 min 63°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>tsh</i>	ggg ggt gca ctg gag tgg agt cca gcg tga tag tgg	620	5 min 94°C / 30 ciclos de 1 min 94°C, 1 min 55°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>iss</i>	gtg gcg aaa act agt aaa aca gc cgc ctc ggg gtg gat aa	760	5 min 94°C / 30 ciclos de 1 min 94°C, 1 min 61°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C

## RESULTS AND DISCUSSION

Many researchers have demonstrated that mechanisms of pathogenicity of APECs are directly related to the interaction of several factors. Such authors have been dedicating themselves to these studies, and in spite of frequency variations, the following main factors are significant: adhesion capacity, colicin production, aerobactin presence, serum resistance, sensitive temperature hemmagglutinin and the presence of certain capsular antigens (Dho & Lafont, 1982; Naveh *et al.*, 1984; Rocha *et al.*, 2002; Ngeleka *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2003; Delicato *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005).

In this study we found the presence of some genes which are determinant in virulency and motility of respiratory isolates. The frequency is described in Table 2.

**Table 2. Frequency of the virulence genes and motility of samples of *Escherichia coli***

<i>cvaC</i> (%)	<i>iss</i> (%)	<i>iutA</i> (%)	<i>kpsII</i> (%)	<i>papC</i> (%)	<i>fel A</i> (%)	<i>tsh</i> (%)	Motilidade (%)
14,0 <b>(23,0)</b>	45,0 <b>(73,8)</b>	28,0 <b>(45,9)</b>	11,0 <b>(18,0)</b>	15,0 <b>(24,6)</b>	24,0 <b>(39,3)</b>	34,0 <b>(55,7)</b>	33,0 <b>(54,1)</b>

In colicin producing samples, the genetic determiners and the proteins that accompany them are located in plasmids, which are called Col factors (Luria, 1987). Colicin V, unlike the other ones, is found mainly in virulent bacteria involved in extra-intestinal infections affecting humans and animals (Gilson *et al.*, 1987, Lior, 1994) and it inhibits the bacterial growth, interfering in the potential of membrane formation (Yang & Kinsky, 1984).

In this study *cvaC* gene, *ColV* plasmid structural gene, were detected in 23% of the samples. Only Blanco *et al.*, (1997) found similar results (22%), while other authors obtained higher percentage. McPeake *et al.*, (2005) reported 99.1% and Rodriguez-Siek *et*

*al.*, (2005) 66.8%. In Brazilian samples the gene has been detected in 35% of them Delicato *et al.*, (2003).

Serum resistance is mediated by the lipopolysaccharids structural surfaces (LPS) of the capsule and other proteic membranes, the presence of outer membrane protein (Gross, 1994) and K1 and K5 antigens, which are codified by *kps* genes (Johnson *et al.*, 2005). Some plasmids are able to transmit serum resistance to sensitive receptive cells. *Iss* genes were identified in pColV-I-K94 plasmids, whose protein is related to citotoxic complex inhibition (Bins at al., 1979). The results produced by the present study are similar to the ones reported by McPeake *et al.*, (2005) and Pfaff-McDonough *et al.*, (2000), 72.8% and 77%. Rodriguez-Siek *et al.* (2005) reported a higher percentage, 81.5%.

The property of invading and multiplying presented by pathogens is influenced by iron availability, which is essential for growth in living cells (Neilands *et al.*, 1985). The aerobactin system enables microorganisms to grow in free iron media at low concentration. *E. Coli* especially uses this way of capture and transport (Braun, 2003; Rohrbach *et al.*, 1995).

The presence of operon aerobactin is in general related to ColV plasmids, although it can be chromosomal (Johnson, 1991; Linggood *et al.*, 1987). Table 2 shows that *iut A* gene, which codifies outer membrane protein aerobactin receptor, was detected in 45.8% of the samples. Gomis *et al.*, (2001) reached similar results (46.8%). Rodriguez-Siek *et al.*, (2005) and Delicato *et al.*, (2003) got 80.2% and 63%. Vandekerchove *et al.*, (2005) presented a lower result (23%). Rodriguez-Siek *et al.*, (2005) detected higher results, 41.2%

A serologic variant of P fimbriae (F11) is codified by the *felA* operon (De Ree *et al.*, 1985). In samples analyzed in the present study, 39.3% were positive for the

presence of this gene. Controversial results are reported by other authors. Delicate *et al.*, (2003) got 12%, while Rodriguez-Siek *et al.*, (2005) found 78%.

In 1994 Provence & Curtiss reported hemagglutination in *E. coli* samples, which was detected only at 26-30°C, and therefore it was called sensitive temperature hemmagglutinin and identified as the *tsh* gene. Its role in the pathogenicity of avian isolates still demands investigation, although its presence in isolated samples obtained from diseased birds has been reported by different authors. In the present work 55.7% of the samples analyzed from litter were positive. Ewers *et al.*, (2004) found 53.3%, while other authors reported 85.3% (Janben *et al.*, 2001), 93.95% (McPeake, 2005) and 99% (Ngeleka *et al.*, 2002).

The flagella, which are thin surface appendixes, give motility to Gram positive and negative bacteria in aqueous media. Their rotating movements allow microorganisms to approach adjacent epithelial cells, crossing the mucus barrier and causing adhesion, multiplication, colonization and infection (La Ragione & Woodward, 2002). In the present study motility was detected in 54.1% of the samples, higher than 36.8% reported by McPeake *et al.*, 2005.

The diversity of genetic profiles which was found in the present study and in other available works suggests the existence of a real interaction among APECs virulence factors. However, despite the technological progress, the contribution to their pathogenicity has not been established so far. Consequently, no significant advance and objective answers to professionals have been obtained.

The growing limitations to antimicrobial uses in avian production, do not allow professionals to be informed about the *E. coli* pathogenic potential to direct their procedures. For this to happen, it is necessary the use of new technology in order to detect isolates pathogenicity in an objective, fast and efficient way.

**Acknowledgements**

To Dr. Benito Guimarães de Brito (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desiderio Finamor/IPVDF) for supplying the *E. coli* strains BK 324 e IAPAR 1315 and Dr. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso (Faculdade de Veterinária-Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS) for supplying the *E. coli* strains ATCC 35278.

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the support providing a scholarship.

## References

- Barnes, H.J.; GROSS, W.B. Colibacillosis. In: Calnek, B.W. (ed). *Diseases of Poultry*. University Press, Ames, Iowa, 1997, p.131-141.
- Barnes, H.J. Pathogenesis of respiratory *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* infections in poultry. Respiratory Diseases of Chicken and Turkeys. AAAP, San Francisco, 1994.
- Bettelheim, K.A. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, ed. Gyles, C.L., Cab International, UK, p. 3-30, 1994.
- Binns, M.M.; Davies, D.L.; Hardy, K.G. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature*, 279:778-781, 1979.
- Blanco, J. E.; Blanco, M.; Mora, A.; Blanco, J. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* 35:2953-2957, 1997
- Brasil. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária/ Delegacia Federal de Agricultura e Reforma Agrária/ Serviço de Inspeção Federal/ Setor de Estatística, 2006.
- Braun, V. Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci.* 8:1409-1421, 2003
- Brito, B. G.; Gaziri, L. C.; Vidotto, M. C. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infect. Immun.* 71:4175-4177, 2003
- De Ree, J. M.; Schwillens, P.; van den Bosch, J. F. Monoclonal antibodies that recognize the P fimbriae F71, F72, F9, and F11 from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 50:900-904, 1985
- Delicato, E. R.; Brito, B. G.; Gaziri, L. C.; Vidotto, M. C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* 94:97-103, 2003
- Delicato, E. R.; Brito, B. G.; Gaziri, L. C.; Vidotto, M. C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* 94:97-103, 2003
- Dho, M.; Lafont, J. P. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. *Avian Dis.* 26:787-797, 1982

Ewers, C.; Janssen, T.; Kiessling, S.; Philipp, H. C.; Wieler, L. H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.* 104:91-101, 2004

Gilson, L.; Mahanty, H. K.; Kolter, R. Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J. Bacteriol.* 169:2466-2470, 1987

Gomis, S. M.; Gomis, A. I.; Horadagoda, N. U.; Wijewardene, T. G.; Allan, B. J.; Potter, A. A. Studies on cellulitis and other disease syndromes caused by *Escherichia coli* in broilers in Sri Lanka. *Trop. Anim Health Prod.* v.32, n.6, p.341-351, 2000

Gomis, S. M.; Riddell, C.; Potter, A. A.; Allan, B. J. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. *Can. J. Vet. Res.* 65:1-6, 2001

Gross, W.G. Diseases due to *Escherichia coli* in Poultry. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, ed. Gyles, C.L., Cab International, UK, p. 237-260, 1994.

Gyles, C.L. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, ed. Gyles, C.L., Cab International, UK p. XIII, 1994.

Janben, T.; Schwarz, C.; Preikschat, P.; Voss, M.; Philipp, H. C.; Wieler, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:371-378, 2001

Johnson, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:80-128, 1991

Johnson, J. R.; Kuskowski, M. A.; Gajewski, A.; Soto, S.; Horcajada, J. P.; Jimenez de Anta, M. T.; Vila, J. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J. Infect. Dis.* 191:46-50, 2005

La Ragione, R. M.; Woodward, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.* 73:27-35, 2002

La Ragione, R. M.; Woodward, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.* 73:27-35, 2002

Linggood, M. A.; Roberts, M.; Ford, S.; Parry, S. H.; Williams, P. H. Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J. Gen. Microbiol.* 133:835-842, 1987

Lior, H. Classification of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, ed. Gyles, C.L., Cab International, UK, p. 31-72, 1994.

Luria. S.E.; Suit, J.L. Colicins and COL Plasmids *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: cellular and molecular Biology. Edited by: Neidhardt, F.C., Washington, D.C., p. 1615-1624, 1987.

McPeake, S. J.; Smyth, J. A.; Ball, H. J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet. Microbiol.* 110:245-253, 2005

Morris, J.A.; Sojka, W.J. *Escherichia coli* as a Pathogen in Animals. The virulence of *Escherichia coli*, ed. M. Sussman, London: Academic Press, 1985, p. 47-77.

Naveh, M. W.; Zusman, T.; Skutelsky, E.; Ron, E. Z. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: effect on pathogenicity. *Avian Dis.* 28:651-661, 1984

Neilands, J. B.; Bindereif, A.; Montgomerie, J. Z. Genetic basis of iron assimilation in pathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 118:179-195, 1985

Ngeleka, M.; Brereton, L.; Brown, G.; Fairbrother, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Dis.* 46:143-152, 2002

Ngeleka, M.; Brereton, L.; Brown, G.; Fairbrother, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Dis.* 46:143-152, 2002

Pfaff-McDonough, S. J.; Horne, S. M.; Giddings, C. W.; Ebert, J. O.; Doetkott, C.; Smith, M. H.; Nolan, L. K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis.* 44:23-33, 2000

Provence, D. L.; Curtiss, R., III. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* 62:1369-1380, 1994

Rocha, A. C.; da Silva, A. B.; Brito, A. B.; Moraes, H. L.; Pontes, A. P.; Ce, M. C.; do, Nascimento, V; Salle, C. T. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Dis.* 46:749-753, 2002

Rodriguez-Siek, K. E.; Giddings, C. W.; Doetkott, C.; Johnson, T. J.; Fakhr, M. K.; Nolan, L. K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology.* 151:2097-2110, 2005

Rohrbach, M. R.; Braun, V.; Koster, W. Ferrichrome transport in *Escherichia coli* K-12: altered substrate specificity of mutated periplasmic FhuD and interaction of FhuD with the integral membrane protein FhuB. *J. Bacteriol.* 177:7186-7193, 1995

Vandekerchove, D.; Vandemaele, F.; Adriaensen, C.; Zaleska, M.; Hernalsteens, J. P.; De Baets, L.; Butaye, P.; Van Immerseel, F.; Wattiau, P.; Laevens, H.; Mast, J.; Goddeeris, B.; Pasmans, F. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Vet. Microbiol.* 108:75-87, 2005

Yang, C.C.; Konisky, J. Colicin V treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. *J. Bacteriol.*, 158:757-7599, 1984.

### 6.3. Artigo 3

#### **Genetic Profile of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from cellulitis lesions poultry litter**

#### **Perfil genético de *Escherichia coli* patogênicas para aves (APEC) isoladas de celulite e cama de frangos de corte**

Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha<sup>1,2\*</sup>; Silvio Luis da Silveira Rocha<sup>2</sup>, Carlos André da Veiga Lima Rosa<sup>3</sup> Guilherme Fonseca de Souza<sup>2</sup>, Hamilton Luiz de Souza Moraes<sup>2</sup>, Rui Fernando Felix Lopes<sup>4</sup>, Obiratã Rodrigues<sup>2</sup>, Carlos Tadeu Pippi Salle<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório DNA, Departamento de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, Brasil

\*Corresponding Autor. Mailing address: Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Av Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel/Fax:(+5551) 33166130/3316-6138. E-mail: ana.crocha@terra.com.br

#### **Abstract**

Skin lesions in chicken flocks are an important problem in the modern poultry industry, consisting in the main agent of condemnation of carcasses in slaughter plants. In several countries cellulitis has been considered responsible for economic losses. Affected flocks cause direct losses in the final product, decrease in the processing speed, workmanship increasing costs, lower values of the final product and extra expenses with cleaning and disinfection in processing plants. Through Polymerase Chain Reaction (PCR) 238 *E. coli* samples were tested in order to detect seven virulence genes. In six genes, *cvaC*, *iss*, *iutA*, *kpsII*, *papC* and *tsh*, a significant statistical difference was detected in *E. coli* isolates from cellulitis lesions and litter.

**keywords:** *Escherichia coli*, virulence, PCR, poultry, cellulitis.

## Resumo

As lesões de pele em frangos de corte são um importante problema na moderna indústria avícola, sendo considerada a principal causa de condenação de carcaças nas plantas de abate. Em diversos países a celulite vem sendo responsável por prejuízos econômicos. Os lotes afetados geram prejuízos através da perda direta do produto, diminuição na velocidade de processamento das aves no abatedouro, aumento do custo da mão de obra e perda de valor do produto final, além de gastos adicionais com a limpeza e desinfecção das instalações das plantas de processamento. Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), 238 amostras de *E. coli* foram testadas para detecção de sete genes de virulência. Em seis genes, *cvaC*, *iss*, *iutA*, *kpsII*, *papC* e *tsh* foi detectada diferença estatística significativa entre os isolados de lesões de celulite e cama.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, virulência, PCR, frango de corte, celulite.

## Introduction:

*Escherichia coli* (*E. coli*) is a potential pathogen due to economic damage that it generates during the whole production cycle. However, the problem can be better evaluated at the slaughterhouse because of the direct loss of the product, the decrease in the bird processing speed at the plant, the increasing cost of workmanship and the loss of value of the final product, besides additional cleaning and disinfection expenses of the facilities in processing plants (26). (Norton *et al.*, 1997)

In Brazil, from 2001 to 2005, the partial or total condemnation carcasses because of the presence of lesions, in which *E. coli* may be the responsible agent, caused serious

damage to the poultry industry estimated at 58 million dollars and from this amount, 19 million were related to the presence of cutaneous lesions of cellulitis (3).

*E. coli* is part of the normal microbiota, however 10-15% of it can be potentially pathogenic(1), so the knowledge of the interaction of factors connected to handling, nutrition, genetics of the birds, immunedepression occurrence and especially the bacterial genetics turned urgent and decisive in the increase the disease.

The virulence mechanisms of avian pathogenic *E. coli* (APEC) have been continuously studied and they are believed to be multi-factorial. Certain properties are primarily associated to virulent samples and have been identified in avian isolates. The most frequently mentioned are: the adhesion capacity (*pap* and *fel*), the colicin production (*cva*), the aerobactin presence (*iut*), the serum resistance (*iss*) (1), temperature-sensitive hemmagglutinin (*tsh*) and the presence of certain capsular antigens (*kps*) (17).

## **Materials and methods:**

### **Bacterial samples:**

Two hundred and thirty-eight (238) *E. coli* isolates from litter (N=78) and cellulitis lesions (N=160) of the same flocks. The samples were collected from 73 different integrated properties of three poultry companies and conserved in Brain Heart Infusion (BHI/ Oxoid, England) with glycerol (Merck, Germany) at 50% in a freezer at -20°C.

### **Motility:**

The samples' motility was verified by the use of SIM Medium -Sulfuric acid indol motility (Merck, Germany)

**Virulence genes:**

*E. coli* was probed by the Polymerase Chain Reaction (PCR) for the presence of genes responsible for the adhesion capacity, P fimbriae (*papC*) and F11 fimbriae (*felA*), colicin production (*cvaC*), aerobactin presence (*iutA*), serum resistance (*iss*), temperature-sensitive hemmagglutinin (*tsh*) and presence of K1 and K5 capsular antigens (*kpsII*).

**PCR:****Extraction of the DNA:**

One mL of suspension was collected from a bacterial culture in BHI of 24h at 37°C. This volume was centrifugated for 5 minutes. The supernatant was rejected and 800µl of the miliQ was added. After having been homogenized, the samples were submitted to a new centrifugation in the same conditions previously mentioned. The supernatant was rejected and 80µl of miliQ water was added. Then the samples were submitted to a temperature of 96°C for 10 minutes in waterbath. The supernatant was removed and maintained frozen until the moment of the analysis.

**Mix:**

For the genes *iutA* and *cvaC* it was used 11.2µl of miliQ water, 2.5µl of PCR buffer 10X (Lab Trad, Brazil), 2µl of dNTP mix with 2.5 mM of each nucleotide (Invitrogen Life Technologies, USA), 2µl of 50mM MgCl<sub>2</sub>, 1µl of 20pM each primers (Invitrogen Life Technologies, USA), 0.3µl of 5U Taq DNA polymerase (Lab Trad., Brazil) and 5µl of template DNA.

For the genes *felA*, *kpsII*, *papC*, *tsh* and *iss* it was used 11.95µl of miliQ water, 2.5µl of PCR buffer 10X (Lab Trad, Brazil), 2µl of dNTP mix with 2.5 mM of each nucleotide (Invitrogen Life Technologies, USA), 1.25µl of 50mM MgCl<sub>2</sub> (Lab Trad,

Brazil), 1µl of 20pM each primers (Invitrogen Life Technologies, USA), 0.3µl of 5U Taq DNA polymerase (Lab Trad., Brazil) and 5µl of template DNA.

The primers were reported in Table 1.

**Amplification:**

The conditions of PCR, the sequence of the primers and the size of the amplified fragment for each studied gene are described in Table 1. The tests were done in thermal cycler PCT-100 (MJ Research) and the amplified DNA was visualized in agarose gel at 1.2% (Invitrogen Life Technologies, USA) contains ethidium bromide (Sigma, USA).

**Reference *E. coli* strains:** BK 324 (*cvaC*, *iss*, *felA*, *papC*, *tsh*), IAPAR 1315 (*iutA*) e ATCC 35278 (*kpsII*).

**Table 1. Sequence of the primers, size of amplified fragments and conditions used in PCR for the detection of the genes associated to the virulence.**

Gene	Primer Sequence 5' – 3'	Fragment Size (bp)	PCR conditions
<i>kpsII</i>	gcg cat ttg ctg ata ctg ttg cat cca gac gat aag cat gag ca	272	5 min 94°C / 30 ciclos 1 min 94°C, 1 min 63°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>cvaC</i>	cac aca caa acg gga gct gtt ctt ccc gca gca tag ttc cat	680	5 min 94°C / 30 ciclos 1 min 94°C, 1 min 63°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>papC</i>	gac ggc tgt act gca ggg tgt ggc g ata tcc ttt ctg cag gga tgc aat a	328	5 min 94°C / 30 ciclos 1 min 94°C, 1 min 63°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>felA</i>	ggc agt ggt gtc ttt tgg tg ggc cca gta aaa gat aat tga acc	270	5 min 94°C / 35 ciclos 1 min 94°C, 1 min 63°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>iutA</i>	ggc tgg aca tca tgg gaa ctg g cgt cgg gaa cgg gta gaa tcg	300	5 min 94°C / 35 ciclos 1 min 94°C, 1 min 63°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>tsh</i>	ggg ggt gca ctg gag tgg agt cca gcg tga tag tgg	620	5 min 94°C / 30 ciclos de 1 min 94°C, 1 min 55°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C
<i>iss</i>	gtg gcg aaa act agt aaa aca gc cgc ctc ggg gtg gat aa	760	5 min 94°C / 30 ciclos de 1 min 94°C, 1 min 61°C e 2 min 72°C / 10 min 72°C

**Statistical analysis:**

The data were analyzed by the chi-square test ( $X^2$ ) of Pearson or exact test of Fischer using the software SgmaStat 2.0. The differences were considered significant when  $P \geq 0.05$ .

**Results and Discussion:**

Many researchers have demonstrated that mechanisms of pathogenicity of APECs are directly related to the interaction of several factors. Such authors such have been dedicating themselves to these studies, and in spite of frequency variations, the following main factors are significant: adhesion capacity, colicin production, aerobactin presence, serum resistance, temperature-sensitive hemmagglutinin and the presence of certain capsular antigens (9, 10, 22, 5, 25, 6, 8, 21).

In this study, samples of *E. coli* isolated from cellulitis lesions were characterized and compared to samples from the litter of the poultry houses in which these birds were raised. The frequency of the virulence genes and motility of the analyzed bacteria are described in Table 2.

**Table 2. Frequency of the virulence genes and motility of samples of *Escherichia coli* isolated from cellulitis and litter of poultry houses.**

	<i>cvaC</i>	<i>iss</i>	<i>iutA</i>	<i>kpsII</i>	<i>papC</i>	<i>felA</i>	<i>tsh</i>	Motility
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
cellulitis (n=160)	50 (31,3)	129 (80,6)	82 (51,3)	44 (27,5)	75 (46,9)	6 (3,8)	83 (51,9)	122 (76,3)
litter (n=78)	9 (11,5)	42 (53,8)	15 (19,2)	7 (9,0)	24 (30,8)	1 (1,3)	14 (17,9)	61 (78,2)
P	0,002	≤0,001	≤0,001	0,002	0,026	0,516	≤0,001	0,863

*CvaC*, *iss*, *iutA*, *kpsII*, *papC*, and *tsh* genes have been studied, and six out of every seven presented significant statistical differences between the isolated samples from cellulitis and litter, and equality was demonstrated only in *felA*. Delicato et al., (2003) demonstrated quite similar results analyzing samples of colibacillosis and feces of clinically healthy birds, pointing out significant differences in *cvaC*, *iss*, *iutA*, *papC*, *tsh* and *felA* genes, and equality in *kpsII*. On the other hand, McPeake et al., (2005) reported differences in *cvaC*, *iss*, e *pap* genes, and equality in *tsh*. However, Brito et al., (2003) verified differences only in *iss*, *iutA*, *kpsII*, and equality in *cvaC*, *papC*, *tsh* and *felA*.

In colicin producing samples, the genetic determiners and the proteins that accompany them are located in plasmids, which are called Col factors (20). Colicin V, unlike the other ones, is found mainly in virulent bacteria involved in extra-intestinal infections affecting humans and animals (11, 19), and it inhibits the bacterial growth, prevented membrane potential formation (31). In this study *cvaC* gene, *ColV* plasmid structural gene, were detected in 31.3% of the cellulitis samples and in 11.5% of the litter samples. Brito et al., (2003) verified the presence of *cvaC* in 48% of the cellulitis

samples and in 33% of fecal samples. Peighambari *et al.* (1995) reported 24.7% in samples isolated from cellulitis and 24% in fecal samples.

Serum resistance is mediated by the lipopolysaccharids (LPS) surfaces structural of the capsule and other proteic membranes, the presence of outer membrane protein (13) and K1 and K5 antigens, which are codified by *kps* genes (16).

Some plasmids are able to transmit serum resistance to sensitive receptive cells. *Iss* genes were identified in pColV-I-K94 plasmids, whose protein is related to cytotoxic complex inhibition (2). This study showed that 80.6% of the cellulitis and 53.8% of the little samples presented *iss* genes. Brito *et al.*, 2003 also observed significant differences, reaching positive results in 83% of cellulitis samples while all the feces samples showed negative results for the presence of the gene.

Table 2 presents positivity for *kps* in 27% of cellulitis samples and in 7% of litter samples. Delicato *et al.* (2003) and Brito *et al.*, (2003) reported significant differences in studied samples as well.

The property of invading and multiplying presented by pathogens is influenced by iron availability, which is essential for growth in living cells (23). The aerobactin system enables microorganisms to grow in free iron media at low concentration. *E. coli* especially uses this way of capture and transport (4, 29). The presence of operon aerobactin is in general related to ColV plasmids, although it can be chromosomal (16, 18). In the present study *iutA* genes, which codifies outer membrane protein aerobactin receptor, were detected in 51.3% of cellulitis samples and in only 19.2% of litter samples. Gomis *et al.* (2001) working with cellulitis isolates reached similar results (44%). Brito *et al.*, (2003) reached higher indexes, 92% of positivity in cellulitis lesions samples and absence of these genes in feces samples.

*E. coli* has got the ability to produce P fimbriae, which represents special advantage for colonization (9) and P fimbriae or chromosome genes have been detected in *E. coli* samples, which cause septicemia in birds, and in fecal samples collected from healthy birds (24). In the present study *papC* genes were detected in 46.9% of cellulitis samples and in 30.8% of feces samples, which was demanded for polymeration and transport of the P fimbriae sub-units, showing significant statistical differences.

Other authors have also verified these genes in cellulitis samples. Ngeleka et al., (1996) detected 51% and Brito et al., (2003) 19.6%. Ngeleka et al., (2002) found the genes in 13% of feces samples and Brito et al., (2003) mentioned the absence of them.

A serologic variant of P fimbriae (F11) is codified by the *felA* operon (7). This gene was detected in 3.8% of cellulitis samples and in 1.3% of feces samples analyzed. Brito et al., (2003) registered 19% in cellulitis samples e absence of them in feces samples.

In 1994 Provence & Curtiss reported hemagglutination in *E. coli* samples, which was detected only at 26-30°C, and therefore it was called sensitive temperature hemmagglutinin. They identified the first gene (*tsh*) connected with this kind of situation. Its role in the pathogenicity of avian isolates still demands investigation, although its presence in isolated samples obtained from sick birds has been reported by different authors. In the present work significant differences were obtained from lesions (83%) or from litter (14%), reinforcing a previous supposition of the importance of this Hemagglutinin. Brito et al., (2003) pointed out such differences, although it was in a lower percentage, 19% in cellulitis isolates and no positive fecal isolates.

The flagella, which are thin surface appendixes, give motility to Gram positive and negative bacteria in aqueous media. Their rotating movements allow microorganisms to approach adjacent epithelial cells, crossing the mucus barrier and

causing adhesion, multiplication, colonization and infection (17). In the present study no significant motility differences were detected, which coincides with Wooley *et al.* (1992) and Brito *et al.*, (2003) results.

The diversity of genetic profiles which was found in the present study and in other available works suggests the existence of a real interaction among APECs virulence factors. However, despite the technological progress, the contribution to their pathogenicity has not been established so far. Consequently, no significant advance and objective answers to professionals have been obtained.

Considering the growing limitations to antimicrobial uses in avian production, professionals need more and more to be informed about the *E. coli* pathogenic potential to direct their procedures. For this to happen, it is necessary the use of new technology in order to detect isolates pathogenicity in an objective, fast and efficient way.

### Acknowledgements

To Dr. Benito Guimarães de Brito (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desiderio Finamor/IPVDF) for supplying the *E. coli* strains BK 324 e IAPAR 1315 and Dr. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso (Faculdade de Veterinária-Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS) for supplying the *E. coli* strains ATCC 35278.

To Dr. Vera Wald for the statistical analysis.

To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the support providing a scholarship.

### References

1. Barnes, H.J.; Gross, W.B. Colibacillosis. In: Calnek, B.W. (ed). *Diseases of Poultry*. University Press, Ames, Iowa, 1997, p.131-141.
2. Binns, M. M.; Davies, D. L.; Hardy, K. G. Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature*. 279:778-781, 1979.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária/ Delegacia Federal de Agricultura e Reforma Agrária/ Serviço de Inspeção Federal/ Setor de Estatística, 2006.
4. Braun, V. Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci*, 8:1409-1421, 2003
5. Brito, B. G.; Gaziri, L. C.; Vidotto, M. C. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infect. Immun.*, 71:4175-4177, 2003
6. De Ree, J. M.; Schwillens, P.; van den Bosch, J. F. Monoclonal antibodies that recognize the P fimbriae F71, F72, F9, and F11 from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 50:900-904, 1985
7. Delicato, E. R.; Brito, B. G.; Gaziri, L. C.; Vidotto, M. C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.*, 94:97-103, 2003
8. Dho, M.; Lafont, J. P. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. *Avian Dis.*, 26:787-797, 1982

9. Dho, M.; Lafont, J. P. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. *Avian Dis.*, 28:1016-1025, 1984
10. Gilson, L.; Mahanty, H. K.; Kolter, R. Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J. Bacteriol.*, 169:2466-2470, 1987
11. Gomis, S. M.; Riddell, C.; Potter, A. A.; Allan, B. J. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. *Can. J. Vet. Res.*, 65:1-6, 2001
12. Gross, W.G. Diseases due to *Escherichia coli* in Poultry. In: Gyles, C.L. (ed). *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. Cab International, UK, 1994, p. 237-260.
13. Gyles, C.L. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, ed. Gyles, C.L., Cab International, UK p. XIII, 1994.
14. Johnson, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4:80-128, 1991
15. Johnson, J. R.; Kuskowski, M. A.; Gajewski, A.; Soto, S.; Horcajada, J. P.; Jimenez de Anta, M. T.; Vila, J. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J. Infect. Dis.*, 191:46-50, 2005
16. La Ragione, R. M.; Woodward, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.*, 73:27-35, 2002
17. Linggood, M. A.; Roberts, M.; Ford, S.; Parry, S. H.; Williams, P. H. Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J. Gen. Microbiol.*, 133:835-842, 1987
18. Lior, H. Classification of *Escherichia coli*. In: Gyles, C.L. (ed). *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. Cab International, UK, 1994, p. 31-72.
19. Luria, S.E.; Suit, J.L. Colicins and COL Plasmids. In: Neidhardt, F.C. (ed). *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: cellular and molecular Biology. Washington, 1987, p. 1615-1624.
20. McPeake, S. J.; Smyth, J. A.; Ball, H. J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet. Microbiol.*, 110: p.245-253, 2005
21. Naveh, M. W.; Zusman, T.; Skutelsky, E.; Ron, E. Z. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: effect on pathogenicity. *Avian Dis.*, 28:p.651-661, 1984
22. Neilands, J. B.; Bindereif, A.; Montgomerie, J. Z. Genetic basis of iron assimilation in pathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 118:179-195, 1985

23. Ngeleka, M.; Kwaga, J. K.; White, D. G.; Whittam, T. S.; Riddell, C.; Goodhope, R.; Potter, A. A.; Allan, B. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect. Immun.*, 64:3118-3126, 1996
24. Ngeleka, M.; Brereton, L.; Brown, G.; Fairbrother, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Dis.*, 46:143-152, 2002
25. Norton, R. A.; Bilgili, S. F.; McMurtrey, B. C. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Dis.*, 41:422-428, 1997
26. Peighambari, S. M.; Vaillancourt, J. P.; Wilson, R. A.; Gyles, C. L. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. *Avian Dis.*, 39:116-124, 1995
27. Provence, D. L.; Curtiss, R., III. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.*, 62:1369-1380, 1994
28. Rocha, A. C.; da Silva, A. B.; Brito, A. B.; Moraes, H. L.; Pontes, A. P.; Ce, M. C.; do Nascimento, V.; Salle, C. T. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Dis.*, 46:749-753, 2002
29. Rohrbach, M. R.; Braun, V.; Koster, W. Ferrichrome transport in *Escherichia coli* K-12: altered substrate specificity of mutated periplasmic FhuD and interaction of FhuD with the integral membrane protein FhuB. *J. Bacteriol.*, 77:7186-7193, 1995
30. Wooley, R. E.; Spears, K. R.; Brown, J.; Nolan, L. K.; Fletcher, O. J. Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.*, 36:679-684, 1992
31. Yang, C. C.; Konisky, J. Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. *J. Bacteriol.*, 158:757-759, 1984

#### 6.4. Artigo 4

### **Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais de Inteligência Artificial) para a Classificação de Patogenicidade de Amostras de *Escherichia Coli* Isoladas de Frangos de Corte**

#### **Use of Artificial Intelligence (Artificial Neural Networks) to classify the pathogenicity of *Escherichia coli* isolates from broilers.**

Carlos Tadeu Pippi Salle<sup>2</sup>, Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha<sup>1,2</sup>, Guilherme Fonseca de Souza<sup>2</sup>, Felipe de Oliveira Salle<sup>2</sup>, Lucas Brunelli de Moraes<sup>2</sup>, Vladimir Pinheiro do Nascimento<sup>2</sup>, Hamilton Luiz de Souza Moraes<sup>2</sup>

#### **Abstract:**

The improvements reached by research in general and the tools which have been used resulted in a better comprehension of the mechanisms of pathogenicity of *E. coli*. However, the differentiation of virulent from non-virulent samples is still a problem for veterinarians to come to a diagnosis and, as a consequence, to make decisions. The present study created neural net of artificial intelligence through the analysis of genes responsible for adhesion capacity, P fimbriae (*papC*) and F11 fimbriae (*felA*), colicin production (*cvaC*), aerobactin presence (*iutA*), serum resistance (*iss*), temperature-sensitive hemmagglutinin (*tsh*) and presence of K1 and K5 capsular antigens (*kpsII*), motility and pathogenicity, so that we could make predictions and classifications of pathogenicity in *E. coli* samples without the need of using animals. In Net 1, using 11 categories of pathogenicity index (PI), we obtained 54.27% of correctness. In order to get a better performance we created a second net, using 3 categories of PI the correct

classification was 80.55%. In order to get an even better performance, we worked with only two categories, building this way the third net. With this new configuration the correct classification was 83.96%.

### **Resumo:**

Os avanços nas pesquisas e nas ferramentas utilizadas vêm resultando no maior entendimento dos mecanismos de patogenicidade das *E. coli* e cada vez mais é demonstrada a grande importância da interação dos diversos fatores de virulência na determinação da patogenicidade. Entretanto, a diferenciação de cepas virulentas e avirulentas continua sendo um problema no diagnóstico e, por consequência, na tomada de decisão pelos veterinários de campo. Neste trabalho são apresentadas três redes neurais de inteligência artificial que foram desenvolvidas através da análise dos genes responsáveis pela capacidade de adesão, fimbria P (*papC*) e fimbria F11 (*felA*), produção de colicinas (*cvaC*), presença de aerobactina (*iutA*), resistência sérica (*iss*), hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) e presença dos antígenos capsulares K1 e K5 (*kpsII*), motilidade e do índice de patogenicidade (IP) para realizarmos a predição ou classificação de patogenicidade de cepas de *E. coli* sem a necessidade da utilização de animais. Na Rede 1, utilizando 11 categorias de IP obtivemos 54,27% de acerto. No intuito de melhorar o desempenho do modelo foi criada uma segunda rede, utilizando 3 categorias de IP a classificação correta de 80,55%. Na tentativa de melhorar ainda mais seu desempenho, passamos a trabalhar com apenas duas categorias construindo, desta forma, a Rede 3. Com esta nova configuração a classificação correta foi de 83,96%.

## 1. Introdução:

É inegável o papel que a *E. coli* vem desempenhando no cenário avícola. Sabemos que os prejuízos econômicos medidos até o momento estão muito longe da realidade vivida no campo e apesar disto as perdas de receita são bastante expressivas. No Brasil entre 2001 e 2005 somente as condenações de carcaça que ocorreram devido à presença de lesões em que a *E. coli* pode ser o agente responsável geraram um prejuízo estimado em 58 milhões de dólares (Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006).

Os mecanismos de virulência das amostras de *E. coli* potencialmente patogênicas para aves (APEC), tem sido continuamente estudados e acredita-se serem multifatoriais. Certas propriedades são associadas primariamente a estas cepas e entre as mais freqüentemente citadas estão: a capacidade de adesão (*pap e fel*) a produção de colicinas (*cva*), a presença de aerobactina (*iut*), a resistência sérica (*iss*) (Barnes, 1994), hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) e a presença de determinados antígenos capsulares (*kps*) (La Ragione & Woodward, 2002).

Os avanços nas pesquisas e nas ferramentas utilizadas vêm resultando no maior entendimento dos mecanismos de patogenicidade e cada vez mais é demonstrada a grande importância da interação dos diversos fatores de virulência na determinação da patogenicidade. Entretanto, a diferenciação de cepas virulentas e avirulentas continua sendo um problema no diagnóstico e, por conseqüência, na tomada de decisão pelos veterinários de campo. Muito provavelmente isto ainda acontece devido à complexidade das interações que existem entre os fatores de virulência das *E. coli* e ao fato dos procedimentos convencionais para a determinação da patogenicidade de *E. coli*, nos quais se inoculam animais, serem demorados, caros e eticamente questionados pela comunidade internacional. Além disto na determinação do índice de patogenicidade "in

vivo", não existe uma padronização de procedimentos e classificações o que impede a comparação dos resultados obtidos. Na tentativa de resolver estes problemas Souza, (2006) propõe uma classificação objetiva e com bases e resultados numéricos o que viabiliza a análise dos dados através de tratamento estatístico e que permite a comparação de resultados. Nesta classificação o índice de patogenicidade tem uma amplitude de 0 a 10.

Acreditamos que uma das ferramentas que tem potencial para o auxílio na resolução dos problemas de ordem ética que envolve a utilização de animais e estabelecer um diagnóstico que inclua o índice de patogenicidade das *E. coli* seja a utilização de modelagens matemáticas, em especial as redes neurais artificiais.

As primeiras informações mencionadas sobre a neuro computação são de 1943, quando que McCulloch e Pitts publicaram Artigos sugerindo a construção de uma máquina baseada ou inspirada no cérebro humano. A rede neural artificial é um sistema de "neurônios" ligados por conexões sinápticas e dividido em "neurônios" de entrada, que recebem estímulos do meio externo, "neurônios" internos ou ocultos e "neurônios" de saída, que se comunicam com o exterior. Os "neurônios" internos são de suma importância na rede neural, pois se provou que sem estes se torna impossível à resolução de problemas linearmente não separáveis. Em outras palavras pode-se dizer que uma rede é composta por várias unidades de processamento, cujo funcionamento é bastante simples. Essas unidades, geralmente são conectadas por canais de comunicação que estão associados a determinado peso. As unidades fazem operações apenas sobre seus dados locais, que são entradas recebidas pelas suas conexões. O comportamento inteligente de uma Rede Neural Artificial vem das interações entre as unidades de processamento da rede. Estes fenômenos variáveis são conhecidos como causalmente

dependentes, mas cuja dependência está além de uma simples relação linear ou não (Tatibana & Kaetsu, 2004).

As redes neurais consistem em um método de solucionar problemas e, diferentemente dos sistemas convencionais, aprende, executa operações não lógicas, descobre as relações ou regras dos dados e exemplos e testa todas as possibilidades em paralelo. A rede neural se baseia nos dados disponíveis para extrair um modelo geral (Tatibana & Kaetsu, 2004). Para que isto seja possível, o sistema deve ser alimentado com dados reais que permita seu treinamento e aprendizado. Sendo assim, a ela é capaz de extrair regras básicas a partir de dados reais.(Forsström & Dalton, 1995). Para que isto ocorra é necessária a análise de um grande número de dados e esta é uma limitação desta ferramenta.

Arquiteturas neurais são tipicamente organizadas em camadas com unidades que podem estar conectadas às unidades da camada posterior. À medida que o aprendizado ocorre, o erro entre a saída da rede e a saída desejada diminui. Usualmente, as camadas são classificadas em três grupos: Camada de Entrada: onde os padrões são apresentados à rede; Camadas Intermediárias ou Ocultas onde é feita a maior parte do processamento, através das conexões ponderadas e podem ser consideradas como extratoras de características; Camada de Saída onde o resultado final é concluído e apresentado. Entretanto raramente revelam o conhecimento que está por trás de seu julgamento. Por esta razão é que são freqüentemente chamadas de “caixas pretas” (Forsström & Dalton,1995).

Aplicações de redes neurais são inúmeras. Já são utilizadas com o objetivo de fazer prognóstico de mercados financeiros; reconhecer e gerar fala; localizar pontos de origem no radar otimizar processos químicos; reconhecer alvos e detectar minas bélicas; identificar células cancerosas; reconhecer anormalidades cromossômicas; detectar

fibrilação ventricular; prever trajetórias de entrada de naves espaciais; reconhecer automaticamente caracteres escritos à mão entre outros. Grupos de investimento também utilizam este tipo de rede para analisar pelo menos uma parte do mercado financeiro (Cheng & Titterton, 1994).

Os trabalhos com *E. coli*, nos quais foram utilizadas redes neurais artificiais, tratam essencialmente de bases de identificação genética de promotores de DNA (O'Neill, 1992; Demeler & Zhou, 1991; Demeler & Zhou, 1991; Kanaya *et al.*, 2001), expressão bioquímica (Hajmeer & Basheer, 2002; Hajmeer & Basheer, 2003), seqüência de DNA (Kanaya *et al.*, 2001), predições de mutagenicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade (Mosier *et al.*, 2003), entre outras.

Estes processos, apesar de não serem bem conhecidos pelos profissionais das áreas ligadas à biologia, vem sendo cada vez mais utilizados. Na área avícola, os primeiros modelos utilizando redes foram publicados por Zhang *et al.* (1996), na área de nutrição. Em sanidade das aves, pesquisadores brasileiros já propuseram o emprego de modelos matemáticos baseados em estatística convencional que explicavam a resposta imunológica de reprodutoras (Salle *et al.*, 1999).

Trabalhos que utilizem redes neurais para a predição da patogenicidade de bactérias não foram encontrados na literatura. Contudo diversos autores vêm tentando estabelecer marcadores de virulência e traçar modelos que contemplem a interação dos fatores mais determinantes.

Considerando que a exploração avícola lida com milhões de animais, e os tratamentos têm um custo proporcional ao tamanho da exploração, e que os resíduos de antibióticos são preocupação constante dos profissionais da avicultura, a predição da patogenicidade da *E. coli* isolada orientará, objetivamente, os procedimentos clínicos que visem o controle da enfermidade. Este trabalho pretende demonstrar que é possível

realizar esta predição com a utilização de redes neurais artificiais e sem a utilização de animais e, com isto, disponibilizar para os veterinários de campo laudos que contenham o grau de patogenicidade das amostras isoladas para que suas decisões sejam mais objetivas e precisas.

É importante ressaltar que com isso o que se pretende é implementar uma ferramenta de auxílio à tomada de decisões, e não um programa que substitua o conhecimento técnico e científico.

## **2. Material e Métodos:**

### **2.1. Base de dados:**

Os dados analisados referem-se à presença dos genes responsáveis pela capacidade de adesão, fimbria P (*papC*) e fimbria F11 (*felA*), produção de colicinas (*cvaC*), presença de aerobactina (*iutA*), resistência sérica (*iss*), hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) e presença dos antígenos capsulares K1 e K5 (*kpsII*), índice ou classificação de patogenicidade (Souza, 2006), motilidade e origem das amostras.

Foram analisadas 293 amostras de *E. coli*. Setenta e seis isoladas de cama, 159 de lesões de celulite e 58 de órgãos de frangos de corte com colisepticemia. As cepas isoladas de cama e de lesões de celulite foram isoladas dos mesmos lotes oriundos de 73 diferentes propriedades. As de quadros de colisepticemia são oriundas de 55 diferentes lotes de frangos de corte nos quais foi observada sintomatologia respiratória e que à necropsia, apresentaram lesões compatíveis com colibacilose.

## 2.2. Redes:

As redes neurais artificiais foram construídas utilizando-se o software Neuroshell Classifier 2.1 (Ward Systems Group, Inc., Frederick, MD, USA)

A construção das redes foi realizada em duas fases distintas: treinamento e validação.

Serão apresentadas três redes onde a camada de entrada incluiu informações sobre a presença dos genes *papC*, *felA*, *cvaC*, *iutA*, *iss*, *tsh* e *kpsII*, motilidade e origem das amostras (colisepticemia, celulite e cama). A camada de saída foi formada pelo "Índice de Patogenicidade (IP)" (Souza, 2006). Na primeira rede o IP varia de 0 a 10. Na segunda, os IP foram agrupados em 3 classes, ou categorias, apatogênica/patogenicidade baixa (AP/PB) com IP entre 0 e 3,99; patogenicidade intermediária (PI) referente aos IP entre 4 e 6,99 e patogenicidade alta (PA) com amplitude de IP entre 7 e 10. Finalmente, foi construída uma terceira rede na qual se procurou retratar a situação prática vivida pelos veterinários no campo onde as bactérias são vistas como de pouca patogenicidade (Apatogênica/Baixa (AP/PB)-IP entre 0 e 3,99) ou patogênicas (Intermediária/Alta (PI/PA)-IP entre 4 e 10). A Tabela 1 sumariza o delineamento das 3 redes.

Denominamos “camada de entrada” o conjunto de variáveis apresentadas para o cálculo do modelo e “camada de saída” a variável a ser predita.

**Tabela 1. Entradas e saída das Redes neurais artificiais para a classificação do Índice de Patogenicidade das amostras de *Escherichia coli*.**

Identificação da RNA	Entrada	Saída
1		IP (0-10)
2	Genes*, motilidade, origem das cepas	AP/B(0-3,99), PI(4-6,99), PA(7-10)
3		AP/PB(0-3,99), PI/PA(4-10)

\**papC*, *felA*, *cvaC*, *iutA*, *iss*, *tsh* e *kpsII*

### 3. Resultados e Discussão:

Os métodos de diagnóstico molecular evoluíram muito e a diversidade de perfis genéticos encontrados nos trabalhos disponíveis na literatura sugerem que existe uma real interação entre os fatores de virulência das *E. coli*. Entretanto, as tentativas de estabelecer marcadores de virulência ainda não resultaram em progressos significativos. Neste estudo, a opção pela verificação da presença dos genes *papC*, *felA*, *cvaC*, *iutA*, *iss*, *tsh* e *kpsII* ocorreu pela diferença de frequências destes genes entre cepas isoladas de aves doentes com as oriundas de aves clinicamente saudáveis ou das fezes (Blanco *et al.*, 1997; Jeffrey *et al.*, 2002; Ngeleka *et al.*, 2002; Brito *et al.*, 2003; Delicato *et al.*, 2003; McPeake *et al.*, 2005).

Os resultados da Rede 1, onde o intervalo do IP de 0 a 10 foi integralmente utilizado, gerando 11 categorias de dados, a classificação correta do IP na fase de treinamento foi de 54,27% (160/293), na validação obteve-se 49,83% (146/293). Os detalhes desta rede estão apresentados na Tabela 2. Entretanto, a especificidade de 9 das 11 categorias de dados foi superior a 95%. A sensibilidade teve grande variação, de 16 a 86% e o índice de acerto das predições, por categoria esteve entre 16 e 80%. Acreditamos que estes últimos dados devem-se a quatro fatores: ao baixo número de amostras por categoria, à grande diversidade de perfis genéticos (73), ao fato de amostras com o mesmo perfil terem apresentado diferentes IPs e a classificação de amostra em categorias adjacentes ou próximas. Na categoria "0" em 73% dos erros a amostra foi classificada como pertencente a categoria "1". Na "1", em 89% as amostras foram classificadas como "0". Na "2", 86% foram classificadas entre as categorias "0" e "1". Na categoria "3", 74% foram classificadas como "0" ou "1". Na "8", 14% foram classificadas como "7" e 57% como "9" ou "10". Na "9", 55% foram classificadas como pertencentes às categorias "7" e "10". Na "10", 75% concentrou-se

na categoria "9". Nas categorias "4", "5", "6" e "7" os erros se concentraram nas categorias "0" e "1". Na "4", 53%, na "5" 70%, na "6" 50% e na "7", 74%.

**Tabela 2. Tabela de Contingência da validação da rede neural artificial 1.**

classificação	Predição										Total	
	"0"	"1"	"2"	"3"	"4"	"5"	"6"	"7"	"8"	"9"		"10"
"0"	45*	16	12	12	9	2	4	4	1	0	0	105
"1"	8	32*	6	5	0	5	3	3	0	3	0	65
"2"	0	0	4*	0	0	0	0	0	1	0	0	5
"3"	1	1	0	7*	1	1	0	1	0	0	0	12
"4"	0	1	0	0	5*	0	2	0	1	1	1	11
"5"	0	0	0	0	1	2*	0	0	0	0	0	3
"6"	0	0	2	0	4	0	11*	1	0	0	0	18
"7"	0	0	0	0	0	1	1	12*	1	2	0	17
"8"	1	0	0	0	0	0	0	0	5*	0	0	6
"9"	1	0	1	4	1	0	3	3	1	14*	3	31
"10"	0	0	0	1	1	1	1	1	3	3	9*	20
Total (N)	56	50	25	29	22	12	25	25	13	23	13	293
Sensibilidade (%)#	80,3	64,0	16,0	24,1	22,7	16,6	44,0	48,0	38,4	60,8	69,2	
Specificidade (%)##	74,6	86,4	99,6	98,1	97,7	99,6	97,3	98,1	99,6	93,7	96,0	

N número de amostras; \* Número de amostras classificadas corretamente; # Positivo verdadeiro; ## Negativo verdadeiro

Como neste trabalho a melhor precisão dos modelos gerados sempre foi buscada, tentamos resolver os problemas de baixo número de amostras por categoria e a classificação de amostra em categorias adjacentes ou próximas reduzindo para três o número de categorias originando a Rede 2: Apatogênica/ Patogenicidade Baixa (AP/PB) com IP entre 0 e 3,99, Patogenicidade Intermediária (PI) com IP variando entre 4 e 6,99 e Patogenicidade Alta (PA) com IP entre 7 e 10. Neste caso, a classificação correta das amostras na fase de treinamento foi de 80,55% (236/293), na validação obteve-se 76,45% (224/293). Os detalhes desta rede estão apresentados na Tabela 3. O menor índice de acertos (41%) ocorreu na categoria denominada de intermediária. Analisando a distribuição dos erros constatamos que em 40% as amostras foram classificadas como de Patogenicidade alta e 60% como Patogenicidade baixa, o que confirma a classificação desta categoria como Intermediária.

**Tabela 3. Tabela de Contingência da validação da rede neural artificial 2.**

Classificação	Predição			Total
	"Apat/Baixa"	"Intermediaria"	"Alta"	
"Alta"	16	14	60*	90
"Intermediaria"	4	24*	2	30
"Apat/Baixa"	140*	21	12	173
Total (N)	160	59	74	293
Sensibilidade (%) #	87,5%	40,68%	81,08%	
Specificidade (%) ##	75,19%	97,44%	86,3%	

N número de amostras; \* Número de amostras classificadas corretamente; # Positivo verdadeiro; ## Negativo verdadeiro

Conforme o esperado, a redução do número de classes melhorou o desempenho da Rede. Na tentativa de melhorar ainda mais seu desempenho, passamos a trabalhar com apenas duas categorias. Desta forma, a Rede 3 foi assim configurada: Apatogênica/Patogenicidade Baixa (AP/PB) com IP entre 0 e 3,99 e Patogenicidade Intermediária/Patogenicidade Alta (PI/PA) com IP variando entre 4 e 10. Esta redução do número de categorias também atende as necessidades dos veterinários de campo e facilita suas decisões, pois as medidas a serem adotadas frente a amostras de *E. coli* de patogenicidade intermediária ou alta são as mesmas. O mesmo ocorre frente a cepas apatogênicas ou de patogenicidade baixa. Com esta configuração a classificação correta das amostras na fase de treinamento foi de 83,96% (246/293) e na validação obtivemos 81,2% (237/293). Os detalhes desta rede estão apresentados na Tabela 4. Predições com porcentagem semelhante foram obtidas por Mosier *et al.* (2003), realizando predições de mutagenicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade de derivados de tiophene obtiveram predições entre 80 e 85% e por O'Neill, (1992), estudando diferentes classes de promotores (seqüências de DNA), com várias funções na *E. coli*, relata nível de acertos entre 63 e 82%. Ambos afirmam que os modelos gerados são considerados muito bons pelo nível de descoberta e avanços que representam frente a situações anteriores.

**Tabela 4 Tabela de Contingência da validação da rede neural artificial 3**

Classificação	Predição		Total
	"Apat/Baixa"	"Inter/Alta"	
"Apat/Baixa"	131*	27	158
"Inter/Alta"	29	106*	135
Total (N)	160	133	293
Sensibilidade#	81,88%	79,7%	
Specificidade##	79,7%	81,88%	

N número de amostras; \* Número de amostras classificadas corretamente; # Positivo verdadeiro; ## Negativo verdadeiro

Para exemplificar a aplicação prática destas redes realizamos simulações com duas novas amostras de *E. coli*, conforme demonstrado nas Tabelas 5 e 6. Para tal utilizamos a rede3, com duas classificações de patogenicidade. No exemplo 1 a cepa foi isolada de lesão de celulite, é imóvel e ao PCR foi positiva para os genes *iss*, *felA* e *tsh*. Na simulação de patogenicidade a amostra foi classificada como de patogenicidade Intermediária/Alta com probabilidade de 99,3% (Figura 1).

**Figura 1.** Simulação de patogenicidade. Exemplo 1

The screenshot shows a software interface for a neural network classifier. At the top, it says "Classifier net, Neural type, 9 inputs, 2 categories". Below this, there is a slider for "Enhanced generalization" set to 50%. The "Manual mode" section contains an "Input values:" table with 9 columns: Lesão (1)/Resp(2) Cama(0), *cvaC*, *iss*, *iutA*, *Fel A*, *KpsII*, *papC*, *tsh*, and Motilidade. The input values are: 1, 0, 1, 0, 1, 0, 0, 1, 0. Below the input table is a "Network prediction:" table with 3 columns: P("Apat/Baixa"), P("Inter/Alta"), and Winner. The prediction results are: 0,007, 0,993, and "Inter/Alta". To the right of the prediction table are three buttons: "Clear All", "Missing value", and "Predict".

Classifier net, Neural type, 9 inputs, 2 categories								
Enhanced generalization:								50%
Manual mode								
Input values:								
Lesão (1)/Resp(2) Cama(0)	<i>cvaC</i>	<i>iss</i>	<i>iutA</i>	<i>Fel A</i>	<i>KpsII</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	Motilidade
1	0	1	0	1	0	0	1	0
Network prediction:								
P("Apat/Baixa")	P("Inter/Alta")	Winner						
0,007	0,993	"Inter/Alta"						

Na segunda simulação também utilizamos a rede3 e a cepa foi isolada de cama é móvel e ao PCR foi positiva para os genes *iutA*, *kpsII* e *tsh*. Na simulação de patogenicidade a amostra foi classificada como apatogênica/patogenicidade baixa com probabilidade de 98,1% (Figura 2).

**Figura 2.** Simulação de patogenicidade. Exemplo 2

Classifier net, Neural type, 9 inputs, 2 categories

Enhanced generalization:  50%

Manual mode

Input values:

Lesão (1)/Resp(2) Cama(0)	cvaC	iss	iutA	Fel A	KpsII	papC	tsh	Motilidade
0	0	0	1	0	1	0	1	1

Network prediction:

P("Apat/Baixa")	P("Inter/Alta")	Winner
0,981	0,019	"Apat/Baixa"

Clear All  
Missing value  
Predict

#### 4. Conclusão:

Os objetivos deste trabalho foram plenamente alcançados. Ao atingirmos percentuais de classificações corretas acima de 80% o método aqui proposto revelou-se uma poderosa ferramenta de suporte às decisões dos médicos veterinários que atuam no campo. As características do modelo permitem a classificação da patogenicidade das amostras isoladas nos galpões com bom grau de confiabilidade, levadas em conta a sensibilidade e a especificidade. Este fato se reveste de importância maior, quando o confrontamos com a rotina vivida por estes profissionais na qual, em geral, só lhes é oferecida a informação do nome da bactéria e eventualmente, um antibiograma nos exames laboratoriais. Assim sendo, o arsenal tecnológico representado pela biologia molecular, neste caso as provas de PCR, fica retido nas fronteiras dos laboratórios e não

tem representado uma ferramenta útil para o trabalho no campo. Adicione-se a resistência, cada vez maior, ao uso de animais experimentais e o quadro se completa. Portanto, o oferecimento de um método de suporte às decisões dos médicos veterinários avícolas trará reflexos na relação custo/benefício dos tratamentos medicamentosos, na menor indução de resistência a antimicrobianos e na redução de resíduos destas drogas nas carnes e ovos, entre outros.

## 5. Referências

1. Blanco, J. E.; Blanco, M.; Mora, A.; Blanco, J. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* v.35, n.11, p.2953-2957, 1997.
2. Barnes, H.J. Pathogenesis of respiratory *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* infections in poultry. *Respiratory Diseases of Chicken and Turkeys*. AAAP, San Francisco, 1994.
3. Barnes, H.J.; Gross, W.B. Colibacillosis. In: Calnek, B.W. (ed). *Diseases of Poultry*. University Press, Ames, Iowa, 1997, p.131-141.
4. BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária/ Serviço de Inspeção Federal, 2006.
5. Brito, B. G.; Gaziri, L. C.; Vidotto, M. C. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infect. Immun.* v.71, n.7, p.4175-4177, 2003.
6. Carson, C. A.; Keller, J. M.; McAdoo, K. K.; Wang, D.; Higgins, B.; Bailey, C. W.; Thorne, J. G.; Payne, B. J.; Skala, M.; Hahn, A. W. *Escherichia coli* O157:H7 restriction pattern recognition by artificial neural network. *J. Clin. Microbiol.* v.33, n.11, p.2894-2898, 1995.
7. Delicato, E. R.; Brito, B. G.; Gaziri, L. C.; Vidotto, M. C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* v.94, n.2, p.97-103, 2003.
8. Demeler, B.; Zhou, G. W. Neural network optimization for *E. coli* promoter prediction. *Nucleic Acids Res.* v.19, n.7, p.1593-1599, 1991.
9. Souza, G., S. Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *escherichia coli* provenientes da produção de frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS, 2006 Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
10. Forsström, Jari J.; DALTON, Kevin J. Artificial neural networks for decision support in clinical medicine. *Annals of Medicine*, n.5, v.27, p.509-517, 1995.
11. Hajmeer, M.; Basheer, I. A probabilistic neural network approach for modeling and classification of bacterial growth/no-growth data. *J. Microbiol. Methods.* v.51, n.2, p.217-226, 2002.
12. Hajmeer, M. N.; Basheer, I. A. A hybrid Bayesian-neural network approach for probabilistic modeling of bacterial growth/no-growth interface. *Int. J. Food Microbiol.* v.82, n.3, p.233-243, 2003.

13. Juncker, A. S.; Willenbrock, H.; Von Heijne, G.; Brunak, S.; Nielsen, H.; Krogh, A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* v.12, n.8, p.1652-1662, 2003.
14. Jeffrey, J. S.; Nolan, L. K.; Tonooka, K. H.; Wolfe, S.; Giddings, C. W.; Horne, S. M.; Foley, S. L.; Lynne, A. M.; Ebert, J. O.; Elijah, L. M.; Bjorklund, G.; Pfaff-McDonough, S. J.; Singer, R. S.; Doetkott, C. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Dis.* v.46, n.1, p.48-52, 2002.
15. Kanaya, S.; Kinouchi, M.; Abe, T.; Kudo, Y.; Yamada, Y.; Nishi, T.; Mori, H.; Ikemura, T. Analysis of codon usage diversity of bacterial genes with a self-organizing map (SOM): characterization of horizontally transferred genes with emphasis on the *E. coli* O157 genome. *Gene.* v.276, n.1-2, p.89-99, 2001.
16. Kennedy, M. J.; Thakur, M. S. The use of neural networks to aid in microorganism identification: a case study of *Haemophilus* species identification. *Antonie Van Leeuwenhoek.* v.63, n.1, p.35-38, 1993.
17. La Ragione, R. M.; Woodward, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.* v.73, n.1, p.27-35, 2002.
18. McPeake, S. J.; Smyth, J. A.; Ball, H. J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet. Microbiol.* v.110, n.3-4, p.245-253, 2005.
19. Mosier, P. D.; Jurs, P. C.; Custer, L. L.; Durham, S. K.; Pearl, G. M. Predicting the genotoxicity of thiophene derivatives from molecular structure. *Chem. Res. Toxicol.* v.16, n.6, p.721-732, 2003.
20. Ngeleka, M.; Brereton, L.; Brown, G.; Fairbrother, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Dis.* v.46, n.1, p.143-152, 2002.
21. O'Neill, M. C. *Escherichia coli* promoters: neural networks develop distinct descriptions in learning to search for promoters of different spacing classes. *Nucleic Acids Res.* v.20, n.13, p.3471-3477, 1992.
22. Ramos-Nino, M. E.; Ramirez-Rodriguez, C. A.; Clifford, M. N.; Adams, M. R. QSARs for the effect of benzaldehydes on foodborne bacteria and the role of sulfhydryl groups as targets of their antibacterial activity. *J. Appl. Microbiol.* v.84, n.2, p.207-212, 1998.

23. Reali, E. H. Utilização de redes inteligência artificial no gerenciamento da produção de frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
  
24. Salle, Carlos Tadeu Pippi; Soares, Roberto Carlos Bastarrica; Cé, Milene Cristine; Moraes, Hamilton Luiz de Souza; Nascimento, Vladimir Pinheiro do; Guahyba, Adriano da Silva. Immune response assessment in turkey breeders vaccinated against Newcastle disease using mathematical models. Abstracts of the 48<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference. Vancouver - Canada, p.129-129, 1999.
  
25. Tatibana & Kaetsu, 2004, disponível em [www.din.uem.br/ia/neurais](http://www.din.uem.br/ia/neurais).
  
26. Zhang, Z; Marquardt, R. R; Wang, G; Guenter, W; Crow, G. H; Han, Z; Bedford, M. R. A simple model for predicting the response of chicks to dietary enzyme supplementation. J. Anim. Sci. v.74, p.394-402, 1996.

## 7. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No início da década de 90 existia uma inquietação na equipe do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária/CDPA-UFRGS. Cerca de 12% dos casos de lotes de aves com problemas respiratórios ficavam com diagnóstico sem conclusão ou incompleto. Nas investigações destes casos, freqüentemente, era isolada *Escherichia coli*. Iniciou-se aí a linha de pesquisa com este microrganismo porque a melhor forma de combater um inimigo é, sem nenhuma dúvida, conhecê-lo melhor.

As perguntas eram muitas. A primeira que deveria ser respondida era: que características teriam estas amostras? Para respondê-la foram investigados 73 lotes com sintomatologia respiratória e o perfil de patogenicidade de 63 amostras foi estabelecido através de testes de expressão de fatores de virulência. Foram estudados fatores de virulência como capacidade de sintetizar hemolisina, motilidade, capacidade de hemoaglutinar, presença do operon *pap*, produção de colicina e resistência sérica. A diversidade de perfis encontrados neste estudo foram indícios da complexidade dos fatores intervenientes na colibacilose aviária e um estímulo ao aprofundamento no tema. Este trabalho gerou uma dissertação de mestrado e um trabalho publicado por Rocha et al., (2002) que consta do corpo desta tese como Artigo 1. A linha de pesquisa avançou e com a utilização dessas 63 amostras outros estudos foram direcionados para a formulação e avaliação de vacinas contra a *E. coli*. Os resultados de Ferreira, (2000) e

Ponsati (2000.) caracterizaram a proteção conferida por bacterinas, autógenas ou mistas, aos frangos de corte ou às reprodutoras e/ou a sua progênie. Embora os resultados demonstrassem presença de anticorpos, medidos por ensaio imuno-enzimático (ELISA), as aves só resistiam ao desafio com amostras patogênicas na primeira semana de vida. Assim sendo, o uso de bacterinas, como foi utilizado nos experimentos citados, não se constituiu em uma arma que atendesse, plenamente, às expectativas nela depositadas.

No final da década de 90 a avicultura brasileira deparou-se com o aumento das lesões de pele e como consequência a elevação das condenações parciais e totais de carcaças, gerando prejuízos econômicos.

No Brasil, Fallavena *et al.* (2000) estudando o problema constataram que a maior parte das lesões tratava-se de celulite. Nas aves esta patologia pode ser causada por diversos microrganismos, porém a *E. coli* é a mais comumente isolada (Gomis *et al.*, 2000; Norton *et al.*, 1999; Norton *et al.*, 1997; Norton *et al.*, 1996; Peighambari *et al.*, 1995; Messier *et al.*, 1993).

Na tentativa de conhecer melhor o problema, e as *E. coli* nele envolvidas, foram coletadas amostras de cama e de pele com lesões de celulite de 73 lotes de frangos de corte. Fonseca (2006) determinou o índice de patogenicidade de 251 das cepas isoladas, utilizando uma nova metodologia.

Nesta nova metodologia empregada para o cálculo do índice de patogenicidade estabelecido por Fonseca, (2006) não são levadas em consideração apenas as porcentagens de animais mortos. Ele contempla também o tempo da morte e as lesões apresentadas em cada um dos animais inoculados, o que o torna mais preciso. Foi acrescentada uma constante de 0,14, que foi denominada Fator de Bonificação de Sobrevivência (FBS), para ser subtraída do valor atribuído à morte da ave, para cada dia que ela sobrevivesse, no período de sete dias no qual os animais foram observados.

Além disto, estabeleceu uma classificação objetiva e com bases em resultados numéricos, com amplitude de 0 a 10, o que viabiliza a análise dos dados através de tratamento estatísticos e permite a comparação de resultados. Com esta nova alternativa, foi possível caracterizar os índices médios de patogenicidade de amostras isoladas nos aviários e estabelecer, com probabilidade estatística, se elas eram diferentes entre si, ou não.

Após conhecermos o índice de patogenicidade de cada amostra, foi estabelecido seu perfil genético através da detecção de seis genes, *cvaC*, *iss*, *iutA*, *kpsII*, *papC*, *felA* e *tsh*, onde foi verificada diferença estatística significativa para *cvaC*, *iss*, *iutA*, *kpsII*, *papC* e *tsh*, entre os isolados de lesões de celulite e de cama, assunto tratado no Artigo 3 deste documento. Este resultado já era esperado uma vez que apenas de 10 a 15% das amostras oriundas de fezes são potencialmente patogênicas. Vale ressaltar que ao analisarmos o conjunto dos resultados dos perfis genéticos e dos índices de patogenicidade encontramos amostras com o mesmo perfil genético, porém com índices de patogenicidade *in vivo* significativamente diferentes. Aparentemente, não havia uma relação linear simples entre a presença dos genes e o respectivo índice de patogenicidade.

Como tínhamos à disposição no CDPA as amostras isoladas de quadros respiratórios, (Artigo 1), estas cepas também tiveram seus índices de patogenicidade e os respectivos perfis genéticos determinados. Os índices de patogenicidade foram caracterizados por Souza (2006) e os perfis genéticos, também compostos pelos genes *cvaC*, *iss*, *iutA*, *kpsII*, *papC*, *felA* e *tsh*. Os perfis fazem parte desta tese e os resultados detalhados são apresentados no Artigo 2. Neste experimento também, repetindo o que já havia ocorrido com as amostras isoladas de celulite e de cama, encontramos amostras com o mesmo perfil genético e com índices de patogenicidade com diferença estatística

significativa. A hipótese de que a relação entre a patogenicidade e o perfil genético não era linear ficou reforçada. Desta forma, foi necessário encontrar uma alternativa que medisse as relações não lineares entre perfil genético e índice de patogenicidade, pois apesar de já termos a disposição os índices de patogenicidade e as características genéticas dos três grupos de amostras analisadas não tínhamos conseguido resolver os problemas enfrentados pelos veterinários no campo. Necessitávamos de uma metodologia que pudesse resolver os problemas de ordem ética que envolve a utilização de animais e de estabelecer um diagnóstico, baseado em laudo laboratorial que incluísse o índice de patogenicidade das *E. coli*. A metodologia escolhida foi o emprego de inteligência artificial, especificamente as redes neurais artificiais, devido a sua capacidade de analisar interações complexas e não lineares.

Com a utilização dos dados de 293 amostras foram então construídos modelos de redes neurais artificiais e três destes modelos estão descritos no Artigo 4 desta tese.

Na Rede 1, na fase de treinamento obtivemos 54,27% de acerto. O objetivo inicial foi alcançado, ou seja, era possível classificar a patogenicidade das amostras bacterianas conhecendo-se o perfil genético das mesmas. Como o objetivo de melhorar a precisão dos modelos as categorias foram reduzidas de 11 para três originando a Rede 2: Neste caso, a classificação correta do IP foi de 80,55%. Conforme o esperado, a redução do número de classes melhorou o desempenho da rede. Na tentativa de melhorar ainda mais seu desempenho, passamos a trabalhar com apenas duas categorias construindo, desta forma, a Rede 3. Esta redução do número de categorias atende as necessidades dos veterinários no campo e facilita suas decisões, pois as medidas a serem adotadas frente a amostras de *E. coli* de patogenicidade intermediária ou alta são as mesmas. O mesmo ocorre frente a *E. coli* apatogênicas ou de patogenicidade baixa. Com esta nova configuração a classificação correta foi de 83,96%. Predições com

porcentagem semelhante foram obtidas por Mosier *et al.* (2003), que realizaram predições de mutagenicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade de derivados de tiophene e obtiveram predições entre 80 e 85% e por O'Neill, (1992), ao estudarem diferentes classes de promotores (seqüências de DNA), com varias funções na *E. coli*, relataram níveis de acertos entre 63 e 82%. Tanto Mosier *et al* como O'Neill afirmaram que os modelos gerados são considerados muito bons pelo nível de descoberta e pelos avanços que representam frente a situações anteriores.

Em termos práticos, ao serem oferecidas como entradas para o funcionamento das redes neurais a origem das amostras, sua motilidade em meios de cultivo e a presença, ou ausência, dos sete genes estudados será obtida como saída a patogenicidade da amostra em questão e a probabilidade de que assim o seja. Sem dúvida, esta informação será de suma importância para aqueles médicos veterinários que, no campo, têm centenas de granjas avícolas sob sua responsabilidade e necessitam decidir, com embasamento científico, quais as estratégias terapêuticas que deverão ser adotadas pelas empresas.

De maneira similar a Mosier *et al.* (2003) e O'Neill, (1992) ressaltamos os avanços alcançados. Ao serem atingidos percentuais de classificações corretas acima de 80% o método aqui proposto revelou-se uma poderosa ferramenta de suporte às decisões dos médicos veterinários que atuam no campo. As características do modelo permitem a classificação da patogenicidade das amostras isoladas nos galpões com bom grau de confiabilidade. Este fato, se reveste de importância maior, quando o confrontamos com a rotina vivida por estes profissionais na qual, em geral, só lhes é oferecida a informação do nome da bactéria nos exames laboratoriais. Assim sendo, o arsenal tecnológico representado pela biologia molecular, neste caso as provas de PCR, fica retido nas fronteiras dos laboratórios e não tem representado uma ferramenta útil para o trabalho no campo. Adicione-se a resistência, cada vez maior, ao uso de animais experimentais e o

quadro se completa. Portanto, o oferecimento de um método de suporte às decisões dos médicos veterinários avícolas trará reflexos na relação custo/benefício dos tratamentos medicamentosos, na menor indução de resistência a antimicrobianos e na redução de resíduos destas drogas nas carnes e ovos, entre outros.

Os projetos com *E. coli* continuam. Já estão em andamento experimentos que visam a elaboração de PCR multiplex que irá baratear e agilizar os testes. Também são conduzidos ensaios para conhecer o perfil de resistência aos antimicrobianos das amostras aqui analisadas. Proximamente, será feita a relação entre as distintas características das amostras de *E. coli* estudadas até agora e os reflexos nos parâmetros de produção de frangos de corte. Todos estes projetos estão sendo realizados sob a forma de dissertações de mestrado ou teses de doutorado.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Astion, M L.; wilding, P. The application of backpropagation neural networks to problems in pathology and laboratory medicine. Arch Pathol Lab Med., v.116, p.995-1001, 1992.

Barnes, H.J. Pathogenesis of respiratory *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* infections in poultry. Respiratory Diseases of Chicken and Turkeys. AAAP, San Francisco, 1994.

Barnes, H.J.; Gross, W.B. Diseases of Poultry. 10<sup>a</sup> edição, ed. B.W. Calnek, Iowa State University Press, Ames, Iowa USA, p. 131-141, 1997.

Bettelheim, K.A. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, ed. Gyles, C.L., Cab International, UK, p. 3-30, 1994.

Bindereif, A.; Neilands, J. B. Aerobactin genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. v.161, n.2, p.727-735, 1985.

Benigni, R.; Giuliani, A. Quantitative modeling and biology: the multivariate approach. American Journal of Physiology 266 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 35), p.R1697-R1704, 1994.

Bindereif, A.; Neilands, J. B. Aerobactin genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. v.161, n.2, p.727-735, 1985.

Binns, M. M.; Davies, D. L.; Hardy, K. G. Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance. Nature. v.279, n.5716, p.778-781, 1979.

Binns, M.M.; Mayden, J.; Levine, R.P. Further Characterization of complement resistance conferred by *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of Col V, I - K94. Infection and Immunity, v. 35, n. 2, p. 654-659, 1982.

Blanco, J. E.; Blanco, M.; Mora, A.; Blanco, J. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* v.35, n.11, p.2953-2957, 1997.

Brasil. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária/ Delegacia Federal de Agricultura e Reforma Agrária/ Serviço de Inspeção Federal/ Setor de Estatística, 2006.

Braun, V. Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci.* v.8, p.s1409-s1421, 2003.

Brée, A.; Dho, M.; Lafont, J.P. Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. *Avian Diseases*, v. 33, p. 134-139, 1989.

Brennand, G.; Magalhães, M.; Ferreira, L.C.S. Colicin production and serum resistance in pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from humans in north east Brazil. *Rev. Bras. Genet.*, v. 12, p. 465-476, 1989.

Brito, B. G.; Gaziri, L. C.; Vidotto, M. C. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infect. Immun.* v.71, n.7, p.4175-4177, 2003.

Carlson, H.C.; Whenham, G.R. Coliform bacteria in chicken broiler house dust and their possible relationship to coli-septicemia. *Avian Diseases*, v. 12, p. 297-302, 1968.

Carson, C. A.; Keller, J. M.; McAdoo, K. K.; Wang, D.; Higgins, B.; Bailey, C. W.; Thorne, J. G.; Payne, B. J.; Skala, M.; Hahn, A. W. *Escherichia coli* O157:H7 restriction pattern recognition by artificial neural network. *J. Clin. Microbiol.* v.33, n.11, p.2894-2898, 1995.

Cavalieri, S. J.; Bohach, G. A.; Snyder, I. S. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.* v.48, n.4, p.326-343, 1984.

Cheng, Bing; Titterington, D. M. Neural Networks: a review from a statistical perspective. *Statistical Science*, v.9, n. 1, p. 2-54, 1994.

Cross, A.S.; Kim, K.S.; Wright, C.; Sadoff, J.C.; Gemski, P. Role of lipopolysaccharide and capsule in the serum resistance of bacteremic strains of *Escherichia coli*. *J. Infect. Diseases*, v. 54, p.497-503, 1986.

De Ree, J. M.; Schwillens, P.; van den Bosch, J. F. Monoclonal antibodies that recognize the P fimbriae F71, F72, F9, and F11 from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* v.50, n.3, p.900-904, 1985.

Delicato, E. R.; Brito, B. G.; Konopatzki, A. P.; Gaziri, L. C.; Vidotto, M. C. Occurrence of the temperature-sensitive hemagglutinin among avian *Escherichia coli*. Avian Dis. v.46, n.3, p.713-716, 2002.

Delicato, E. R.; Brito, B. G.; Gaziri, L. C.; Vidotto, M. C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. Vet. Microbiol. v.94, n.2, p.97-103, 2003.

Demeler, B.; Zhou, G. W. Neural network optimization for *E. coli* promoter prediction. Nucleic Acids Res. v.19, n.7, p.1593-1599, 1991.

Dho, M.; Lafont, J. P. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. Avian Dis. v.26, n.4, p.787-797, 1982.

Dho, M.; Lafont, J. P. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. Avian Dis. v.28, n.4, p.1016-1025, 1984.

Dozois, C.M. Fairbrother, J.M.; Harel, J.; Bossée, M. *pap*- and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. Infect. Immun., v. 60, p. 2648-2656, 1992.

Dozois, C.M. Chanteloup, N.; Dho-Moulin, M.; Bree, A.; Desautels, C.; Fairbrother, J.M. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (Type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. Avian Diseases, v. 38, p. 231-239, 1994.

Eisenstein, B.I. Fimbriae *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: cellular and molecular Biology. Edited by: Neidhardt, F.C., Washington, D.C., v. 1, p. 84-90, 1987.

Elfadil, A. A.; Vaillancourt, J. P.; Meek, A. H. Farm management risk factors associated with cellulitis in broiler chickens in southern Ontario. Avian Dis. v.40, n.3, p.699-706, 1996.

Elfadil, A. A.; Vaillancourt, J. P.; Meek, A. H.; Gyles, C. L. A prospective study of cellulitis in broiler chickens in southern Ontario. Avian Dis. v.40, n.3, p.677-689, 1996.

Elfadil, A. A.; Vaillancourt, J. P.; Meek, A. H.; Julian, R. J.; Gyles, C. L. Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. Avian Dis. v.40, n.3, p.690-698, 1996.

Emery, D.A.; Nagaraja, K.V.; Shaw, D.P.; Newman, J.A.; White, D.G. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. Avian Diseases., v. 36, p. 504-511, 1992.

Ewers, C.; Janssen, T.; Kiessling, S.; Philipp, H. C.; Wieler, L. H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. Vet. Microbiol. v.104, n.1-2, p.91-101, 2004.

Fallavena, L. C. B.; Moraes, H. L. S.; Salle, C. T. P.; Silva, A. B.; Vargas, R. S.; Nascimento, V. P.; Canal, C. W. Diagnosis of skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses - a microscopic and macroscopic study. *Avian Pathol.* v.29, p.557-562, 2000.

Ferreira, S. R.. Avaliação, através do teste de ELISA e teste de desafio, de três bacterinas contra a infecção respiratória promovida pela *Escherichia coli*, isoladas de frangos de corte do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, 2000. 94p. Defendida por. Dissertação de mestrado (mestre em ciências Veterinárias), faculdade de veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Forsström, Jari J.; DALTON, Kevin J. Artificial neural networks for decision support in clinical medicine. *Annals of Medicine*, n.5, v.27, p.509-517, 1995.

Gilson, L.; Mahanty, H. K.; Kolter, R. Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J. Bacteriol.* v.169, n.6, p.2466-2470, 1987.

Gilson, L.; Mahanty, H. K.; Kolter, R. Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J.* v.9, n.12, p.3875-3894, 1990.

Goes, C. R.; Gaziri, L. C.; Vidotto, M. C. Cloned genes of the aerobactin system of virulent avian *Escherichia coli* do not confer virulence to recombinant strains. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.26, n.3, p.261-275, 1993.

Goldman, R.C.; Joiner, K.; Leive, L. Serum-resistant Mutants of *Escherichia coli* O111 Contain Increased Lipopolysaccharide, Lack on O Antigen-containing Capsule, and Cover More of Their Lipid A Core with O Antigen. *Journal of Bacteriology*, v. 159, p. 877-882, 1984.

Gomis, S. M.; Gomis, A. I.; Horadagoda, N. U.; Wijewardene, T. G.; Allan, B. J.; Potter, A. A. Studies on cellulitis and other disease syndromes caused by *Escherichia coli* in broilers in Sri Lanka. *Trop. Anim Health Prod.* v.32, n.6, p.341-351, 2000.

Gjessing, K.M.; berkhoff, H.A. Experimental reproduction of airsacculitis and septicemia by aerosol exposure of 1-day-old chickens using Congo Red-positive *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, v. 33, n. 3, p. 473-478, 1989.

Gomis, S. M.; Watts, T.; Riddell, C.; Potter, A. A.; Allan, B. J. Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. *Avian Dis.* v.41, n.1, p.234-240, 1997.

Gomis, S. M.; Riddell, C.; Potter, A. A.; Allan, B. J. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. *Can. J. Vet. Res.* v.65, n.1, p.1-6, 2001.

Göranson, M.; Uhlin, B. Environmental temperature regulates transcription of a virulence pili operon in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, v. 3, p. 2885-2888, 1984.

Goren, E., Bacterial Drug Resistance is Still a Major Problem. *World Poultry*, v. 4, p. 53, 1994.

Gross, W.G. The development of "Air Sac Diseases". *Avian Diseases* v. 5, p. 431-439, 1961.

Gross, W.G. Factors Affecting the Development of Respiratory Diseases Complex in Chickens. *Avian Diseases*, v. 34, p. 607-610, 1990.

Gyimah, J.E.; Panigrahy, B. Adhesin-receptor Interactions Mediating the Attachment of Pathogenic *Escherichia coli* to Chicken Tracheal Epithelium. *Avian Diseases*, v. 32, p. 74-78, 1988.

Hajmeer, M.; Basheer, I. A probabilistic neural network approach for modeling and classification of bacterial growth/no-growth data. *J. Microbiol. Methods*. v.51, n.2, p.217-226, 2002.

Hajmeer, M. N.; Basheer, I. A. A hybrid Bayesian-neural network approach for probabilistic modeling of bacterial growth/no-growth interface. *Int. J. Food Microbiol.* v.82, n.3, p.233-243, 2003.

Hedges, A.J. Antimicrobial substances. *Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*, ed. Parker, M.T.; Collis, L.H., v. 1, p. 151-152, 1990.

Hoschützky, H.; Lottspeich, F.; Jann, K. Isolation and Characterization of the  $\alpha$ -Galactosyl-1, 4- $\beta$ -Galactosyl- Specific Adhesin (P Adhesin) from Frimbriated *Escherichia coli*, p. 76-81, 1989.

Jann, K.; Jann, B. Schmidt, G. SDS polyacrylamide gel electrophoresis and serological analysis of pili from *Escherichia coli* of different pathogenic origin. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 11, p. 21-25, 1981.

Janben, T.; Schwarz, C.; Preikschat, P.; Voss, M.; Philipp, H. C.; Wieler, L. H. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.* v.291, n.5, p.371-378, 2001.

Jeffrey, J. S.; Chin, R. P.; Singer, R. S. Assessing cellulitis pathogenicity of *Escherichia coli* isolates in broiler chickens assessed by an in vivo inoculation model. *Avian Dis.* v.43, n.3, p.491-496, 1999.

Jeffrey, J. S.; Nolan, L. K.; Tonooka, K. H.; Wolfe, S.; Giddings, C. W.; Horne, S. M.; Foley, S. L.; Lynne, A. M.; Ebert, J. O.; Elijah, L. M.; Bjorklund, G.; Pfaff-McDonough, S. J.; Singer, R. S.; Doetkott, C. Virulence factors of *Escherichia coli* from cellulitis or colisepticemia lesions in chickens. *Avian Dis.* v.46, n.1, p.48-52, 2002

Johnson, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* v.4, n.1, p.80-128, 1991.

Johnson, J. R.; Kuskowski, M. A.; Gajewski, A.; Soto, S.; Horcajada, J. P.; Jimenez de Anta, M. T.; Vila, J. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J. Infect. Dis.* v.191, n.1, p.46-50, 2005.

Joiner, K.A.; Goldman, R.C.; Hammer, C.H.; Leive, L.; Frank, M.M. Studies of the mechanisms of bacterial resistance to complement-mediated killing. IgG and F(ab')<sub>2</sub> mediated killing of *Escherichia coli* 011184 by the alternative complement pathway without increasing C5b-9 deposition. *J. Immunol.*, v. 131, p. 2563-9, 1983.

Joiner, K.A. Complement Evasion by Bacteria and Parasites. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 42, p. 201-230, 1988.

Juncker, A. S.; Willenbrock, H.; Von Heijne, G.; Brunak, S.; Nielsen, H.; Krogh, A. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* v.12, n.8, p.1652-1662, 2003.

Kanaya, S.; Kinouchi, M.; Abe, T.; Kudo, Y.; Yamada, Y.; Nishi, T.; Mori, H.; Ikemura, T. Analysis of codon usage diversity of bacterial genes with a self-organizing map (SOM): characterization of horizontally transferred genes with emphasis on the *E. coli* O157 genome. *Gene.* v.276, n.1-2, p.89-99, 2001.

Kennedy, M. J.; Thakur, M. S. The use of neural networks to aid in microorganism identification: a case study of *Haemophilus* species identification. *Antonie Van Leeuwenhoek.* v.63, n.1, p.35-38, 1993.

Kiselius, P.V.; Schwan, W.R.; Amundsen, S.K.; Duncan, J.L.; Schaeffer, A.J., In vivo expression and variation of *Escherichia coli* type 1 and P pili in urine of adults with acute urinary tract infections. *Infect. Immun.*, v. 57, p. 1656-1662, 1989.

Kovács, Z. L. *Redes Neurais Artificiais: Fundamentos e Aplicações: um texto básico.* 2 ed. São Paulo: Edição acadêmica, 1996. 174p.

Kumor, L. W.; Olkowski, A. A.; Gomis, S. M.; Allan, B. J. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. *Avian Dis.* v.42, n.2, p.285-291, 1998.

La Ragione, R. M.; Woodward, M. J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.* v.73, n.1, p.27-35, 2002.

Linggood, M. A.; Roberts, M.; Ford, S.; Parry, S. H.; Williams, P. H. Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J. Gen. Microbiol.* v.133 ( Pt 4), p.835-842, 1987.

Lior, H. Classification of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, ed. Gyles, C.L., Cab International, UK, p. 31-72, 1994.

Leive, L. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 21, p. 290-296, 1965.

Lund, B.; Lindberg, F.; Marklund, B.,I.; Normak, S., The pap G protein is the  $\alpha$ -D-galactopyranosyl (1-4)- $\beta$ -D-galactopyranose-binding adhesin of uropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 5898-5902, 1987.

Luria. S.E.; Suit, J.L. Colicins and COL Plasmids *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: cellular and molecular Biology. Edited by: Neidhardt, F.C., Washington, D.C., v. 2, p. 1615-1624, 1987.

Maurer, J. J.; Brown, T. P.; Steffens, W. L.; Thayer, S. G. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. Avian Dis. v.42, n.1, p.106-118, 1998.

McPeake, S. J.; Smyth, J. A.; Ball, H. J. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. Vet. Microbiol. v.110, n.3-4, p.245-253, 2005.

Messier, S.; Quessy, S.; Robinson, Y.; Devriese, L. A.; Hommez, J.; Fairbrother, J. M. Focal dermatitis and cellulitis in broiler chickens: bacteriological and pathological findings. Avian Dis. v.37, n.3, p.839-844, 1993.

Moll., A.; Cabello, F.; Timmis, K. Rapid assay for the determination of bacterial resistance to the lethal activity of serum. FEMS Microb. Letters, v. 6, p. 273-276, 1979.

Montgomerie, J.Z.; Bindereif, A.; Neilands, J.B.; Kalmason, G.M.; Guze, L.B. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. Infect. Immun., v. 46, p. 835-838, 1984.

Moorhead, P.D.; Saif, G.M. *Mycoplasma meleagridis* and *Escherichia coli* Infections in Germfree and Specific Pathologic Manifestation. Am. J. Vet. Res., v. 31, p. 1645-1653, 1970.

Morris, J.A.; Sojka, W.J. *Escherichia coli* as a Pathogen in Animals. The virulence of *Escherichia coli*, ed. M. Sussman, London: Academic Press, 1985, p. 47-77.

Mosier, P. D.; Jurs, P. C.; Custer, L. L.; Durham, S. K.; Pearl, G. M. Predicting the genotoxicity of thiophene derivatives from molecular structure. Chem. Res. Toxicol. v.16, n.6, p.721-732, 2003.

Nakamura, K. Effect of infectious bursal diseases virus on infection produced by *Escherichia coli* of high and low virulence in chickens. Avian Pathology, v. 19, p. 713-721, 1990.

Naveh, M. W.; Zusman, T.; Skutelsky, E.; Ron, E. Z. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: effect on pathogenicity. Avian Dis. v.28, n.3, p.651-661, 1984.

Neilands, J. B. Iron absorption and transport in microorganisms. Annu. Rev. Nutr. v.1, p.27-46, 1981.

Neilands, J. B.; Bindereif, A.; Montgomerie, J. Z. Genetic basis of iron assimilation in pathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v.118, p.179-195, 1985.

Ngeleka, M.; Brereton, L.; Brown, G.; Fairbrother, J. M. Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Dis.* v.46, n.1, p.143-152, 2002.

Ngeleka, M.; Kwaga, J. K.; White, D. G.; Whittam, T. S.; Riddell, C.; Goodhope, R.; Potter, A. A.; Allan, B. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect. Immun.* v.64, n.8, p.3118-3126, 1996.

North, M.O. Commercial chicken production manual. 2<sup>o</sup> ed. Avi Publishing Company, Westport, 692 p., 1978.

Norton, R. A.; Bilgili, S. F.; McMurtrey, B. C. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Dis.* v.41, n.2, p.422-428, 1997.

Norton, R. A.; Macklin, K. S.; McMurtrey, B. L. Evaluation of scratches as an essential element in the development of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Dis.* v.43, n.2, p.320-325, 1999.

Oderkirk, A.; Broiler cellulitis. Poultry Fact Sheet. NS Department of Agriculture and Fisheries. Disponivel em <http://www.gov.ns.ca/nsaf/elibrary/archive/lives/poultry/broilers/celulite.htm#intro>, 2004.

Old, D.C. Haemagglutination Methods in the Study of *Escherichia coli* In: The virulence of *Escherichia coli*, ed. M. Sussman, Academic Press, London, p. 287-313, 1985.

ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. Serology of *Escherichia coli* Fimbriae. *Prog. Allergy*, v. 33, p. 80-105, 1983.

Ørskov, F.; Ørskov, I. *Escherichia coli* sorotyping and diseases in man and animals. *Canadian J. of Microbiol.*, v. 38, p. 699-704, 1992.

O'Neill, M. C. *Escherichia coli* promoters: neural networks develop distinct descriptions in learning to search for promoters of different spacing classes. *Nucleic Acids Res.* v.20, n.13, p.3471-3477, 1992.

Parreira, V.R.; Arns, C.W.; Yano, T. Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome. *Avian Pathology*, v. 27, p. 148-154, 1998.

Parry, S.H.; Rooke, D.M. Adhesins and colonization factors of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. The virulence of *Escherichia coli*. Academic Press, p. 79-155, 1985.

Peighambari, S. M.; Julian, R. J.; Vaillancourt, J. P.; Gyles, C. L. *Escherichia coli* cellulitis: experimental infections in broiler chickens. *Avian Dis.* v.39, n.1, p.125-134, 1995.

Pfaff-McDonough, S. J.; Horne, S. M.; Giddings, C. W.; Ebert, J. O.; Doetkott, C.; Smith, M. H.; Nolan, L. K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis.* v.44, n.1, p.23-33, 2000.

Ponsati, R. M. Imunidade Passiva conferida à progênie de matrizes de corte imunizadas com bacterina oleosa contra *Escherichia coli*. Porto Alegre: UFRGS, 2000. 94p. Defendida por. Dissertação de mestrado (mestre em ciências Veterinárias), faculdade de veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

Pourbakhsh, S. A.; Boulianne, M.; Martineau-Doize, B.; Dozois, C. M.; Desautels, C.; Fairbrother, J. M. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Dis.* v.41, n.1, p.221-233, 1997.

Provence, D. L.; Curtiss, R., III. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* v.62, n.4, p.1369-1380, 1994.

Rocha, A. C.; da Silva, A. B.; Brito, A. B.; Moraes, H. L.; Pontes, A. P.; Ce, M. C.; do, Nascimento, V.; Salle, C. T. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Dis.* v.46, n.3, p.749-753, 2002.

Ramos-Nino, M. E.; Ramirez-Rodriguez, C. A.; Clifford, M. N.; Adams, M. R. QSARs for the effect of benzaldehydes on foodborne bacteria and the role of sulfhydryl groups as targets of their antibacterial activity. *J. Appl. Microbiol.* v.84, n.2, p.207-212, 1998.

Randall, C. J.; Meakins, P. A.; Harris, M. P.; Watt, D. J. A new skin disease in broilers? *Vet. Rec.* v.114, n.10, p.246-, 1984.

Rivas, Octavio Campollo. Modelos matemáticos en medicina y biología. Bases teóricas y fundamentos. *La Revista de Investigación Clínica, México - D.F.*, v.46, n.4, p.307-321, jul/ago 1994.

Reali, E. H. Utilização de redes inteligência artificial no gerenciamento da produção de frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Reynard, A.M.; Beck, M.E. Plasmid-mediated resistance to the bactericidal effects of normal rabbit serum. *Infect. Immun.*, v. 14, p. 848-850, 1976.

Roantree, R.J.; Rantz, L.A. A study of the relationship of the normal bactericidal activity of human serum to bacterial infection. *J. Clin. Invest.*, v. 39 p. 72-81, 1960.

Roush, W.B.; Kirby, Y. Kochera; Cravener, T.L.; Wideman JR., R.F. Artificial neural network prediction of ascites in broilers. *Poultry Science*, v.75, p.1479-1487, 1996.

Rodriguez-Siek, K. E.; Giddings, C. W.; Doetkott, C.; Johnson, T. J.; Fakhr, M. K.; Nolan, L. K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*. v.151, n.Pt 6, p.2097-2110, 2005.

Rohrbach, M. R.; Braun, V.; Koster, W. Ferrichrome transport in *Escherichia coli* K-12: altered substrate specificity of mutated periplasmic FhuD and interaction of FhuD with the integral membrane protein FhuB. *J. Bacteriol.* v.177, n.24, p.7186-7193, 1995.

Rosenberger, J. K.; Fries, P. A.; Cloud, S. S.; Wilson, R. A. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. II. Factors associated with pathogenicity. *Avian Dis.* v.29, n.4, p.1094-1107, 1985.

Saif, Y.M.; Moorhead, P.D.; Bohl, E.H. *Mycoplasma meleagridis* and *Escherichia coli* infections in germfree and specific-pathogen-free turkey poults: Production of complicated airsacculitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 31 p. 1637-1643, 1970.

Salle, C. T. P.; Soares, R. B.; Cé, M. C.; Silva, A. B.; Moraes, H. L. S.; Nascimento, V. P.; GUAHYBA, A. S. Modelos matemáticos para avaliar a resposta imune de aves à doença de Newcastle. *A Hora Veterinária - Ano 17, Porto Alegre - RS*, n.102, p.41-44, mar/abr/1998.

Salle, C. T. P.; Cé, M. C.; Santos, C. H. C.; Guahyba, A. S.; Nascimento, V. P.; Moraes, Hamilton L. S. Use of statistical technique on the interpretation of routine serologic data produced by poultry industry. In: *Asia-Pacific Poultry Health Conference, 4., 1998, Melbourne - Australia. Abstracts.* Melbourne: Australian Veterinary Poultry Association, p.148, 1998.

Salle, C. T. P.; Soares, R. C. B.; Cé, M. C.e; Guahyba, A. S.; Moraes, H. L. S.; Nascimento, V. P. Immune response assessment in turkey breeder (*Meleagris gallopavo*) under Newcastle vaccine virus by mathematical models. In: *Asia-Pacific Poultry Health Conference, 4., 1998, Melbourne - Australia. Abstracts.* Melbourne: Australian Veterinary Poultry Association, p.148, 1998.

Salle, C. T. P.; Cé, M. C.; Lorenzini, G.; Sfoggia, M. V. B.; Guahyba, A. S.; Moraes, H. L. S.; Nascimento, V. P. Correlation between aflatoxin and ocratoxin levels with production parameters in a poultry company. In: Western Poultry Disease Conference, 48., 1999, Vancouver - Canada. Abstracts. Vancouver: American Association of Avian Pathologists (AAAP), p.130, 1999.

Salle, C. T. P.; Cé, M. C.; Santos, C. H. C.; Guahyba, A. S.; Nascimento, V. P.; Moraes, H. L. S. Use of statistical techniques on the interpretation of routine serological data produced by a poultry industry. In: Western Poultry Disease Conference, 48., 1999, Vancouver - Canada. Abstracts. Vancouver: American Association of Avian Pathologists (AAAP), p.130, 1999.

Salle, C. T. P.; Soares, R. C. B.; Cé, M. C.; Moraes, H. L. S.; Nascimento, V. P.; Guahyba, A. S. Immune response assessment in turkey breeders vaccinated against Newcastle disease using mathematical models. In: Western Poultry Disease Conference, 48., 1999, Vancouver - Canada. Abstracts. Vancouver: American Association of Avian Pathologists (AAAP), p.129, 1999.

Salle, C. T. P & Silva, A. B. Prevenção de Doenças / Manejo Profilático / Monitorização. In: BERCHIERI JUNIOR, Angelo, MACARI, Marcos. Doenças das Aves, Campinas - SP, 1ed., v.01, p.03-12, 2000.

Salle, C.T.P.S., Guahyba, A.S., Wald, V. B. Use of artificial neural networks to estimate production parameters of broiler breeders in breeding phase. Rev. Bras. Cienc. Avic., Sep./Dec. 2001, vol.3, nº. 3, p. 257-264.

Salle, F. O. Utilização de Inteligência Artificial (redes neurais de inteligência artificial) no gerenciamento do incubatório de uma empresa avícola do sul do Brasil . Porto Alegre: UFRGS, 2005 Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sheffer, J.; Koning, W.; Kacker, J.; Goebel, W. Bacterial adherence and hemolysin production from *Escherichia coli* induce histamine and leucotriene release from various cells. Infect. Immun., v. 50, p. 271-278, 1985.

Smith, H.W. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicin V. J. Gen. Microbiol., v. 83, p. 96-111, 1974.

Smith, H.W.; Huggins, M.B. Further observations on the Colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. J. Gen. Microbiol., v. 92, p. 335-50, 1976.

Smyth, C.J.; Marron, M.; Smith, S.G.J. Fimbriae of *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, ed. Gyles, C.L., Cab International, UK, p. 399-435, 1994.

Souza, G., F. Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS, 2006 Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Stathopoulos, C.; Provence, D. L.; Curtiss, R., III. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infect. Immun.* v.67, n.2, p.772-781, 1999.

Stocki, S. L.; Babiuk, L. A.; Rawlyk, N. A.; Potter, A. A.; Allan, B. J. Identification of genomic differences between *Escherichia coli* strains pathogenic for poultry and *E. coli* K-12 MG1655 using suppression subtractive hybridization analysis. *Microb. Pathog.* v.33, n.6, p.289-298, 2002.

Stuart, S. J.; Greenwood, K. T.; Luke, R. K. Hydroxamate-mediated transport of iron controlled by ColV plasmids. *J. Bacteriol.* v.143, n.1, p.35-42, 1980.

Suwanichkul, A.; Panigrahy, B. Diversity of pilus subunits of *Escherichia coli* isolated from avian species. *Avian Dis.* v.32, n.4, p.822-825, 1988.

Tatibana & Kaetsu, disponível em [www.din.uem.br/ia/neurais](http://www.din.uem.br/ia/neurais), 2004.

Taylor, P.W. Genetical studies of serum resistance in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 89 p. 57-66, 1975.

Taylor, P.W. Bactericidal and Bacteriolytic Activity of Serum Against Gram-negative Bacteria. *Microbiological Reviews*, v. 47, n. 1, p. 46-83, 1983.

União brasileira de avicultura-UBA. Números da Avicultura Brasileira. Disponível por <http://www.uba.org.br>. Relatório anual 2005/2006.

Valvano, M.A. Pathogenicity and molecular genetics of O-specific side-chain lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, v. 38, p. 711-719, 1992.

Vandekerchove, D.; Vandemaele, F.; Adriaensen, C.; Zaleska, M.; Hernalsteens, J. P.; De Baets, L.; Butaye, P.; Van Immerseel, F.; Wattiau, P.; Laevens, H.; Mast, J.; Goddeeris, B.; Pasmans, F. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Vet. Microbiol.* v.108, n.1-2, p.75-87, 2005.

Vidotto, M. C.; Cacao; Goes, C. R.; Santos, D. S. Plasmid coding for aerobactin production and drug resistance is involved in virulence of *Escherichia coli* avian strains. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.24, n.7, p.649-675, 1991.

Waters, V. L.; Crosa, J. H. Colicin V virulence plasmids. *Microbiol. Rev.* v.55, n.3, p.437-450, 1991.

Williams, S.H. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V. *J. Gen. Microbiol.*, v. 83, p. 95-111, 1974.

Williams, P.H.; Warner, P.J. Col V plasmid-mediated, colicin V-independent iron uptake system of invasive strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, v. 29, p. 11-6, 1980.

Woodrow, G. C.; Langman, L.; Young, I. G.; Gibson, F. Mutations affecting the citrate-dependent iron uptake system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* v.133, n.3, p.1524-1526, 1978.

Wooley, R.E.; Spears, K.R.; Brown, J.; Nolan, L.K.; Fletcher, O.J. Relationship of Complement Resistance and Selected Virulence Factors in Pathogenic Avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, v. 36, n. 3, p. 679-684, 1992.

Wooley, R.E.; Nolan, L.K.; Brown, J.; Gibbs, P.S.; Giddings, C.W.; Turner, K.S. Association of K-1 capsule smooth lipopolysaccharides, traT gene, and colicin V production with complement resistance and virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, v. 37, p. 1092-1096, 1993.

Wooley, R.E.; Brown, J.; Gibbs, P.S.; Nolan, L.K.; Turner, K.R. Effect of Normal Intestinal Flora of Chickens on Colonization by Avian *Escherichia coli* Virulent and Avirulent - Producing, Mutant Colicin V. *Avian Diseases*, v. 38, p. 141-145, 1994a.

Wooley, R.E.; Nolan, L.K.; Brown, J.; Gibbs, P.S.; Bounous, D.I. Phenotypic expression of recombinant plasmid pKT107 and pHK11 in a avirulent avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, v. 38, p. 127-134, 1994b.

Yang, C. C.; Konisky, J. Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. *J. Bacteriol.* v.158, n.2, p.757-759, 1984.

Yoder, H.W.; Beard, C.W.; Mitchell, B.W. Pathogenicity of *Escherichia coli* in Aerosols for Young Chickens. *Avian Diseases*, v. 33, n. 4, p. 676-683, 1989.

Xin, H. Assessing swine thermal comfort by image analysis of postural behaviors. *J. Anim. Sci.*, v.77, suppl.2/J, Dairy Sci., v.82, suppl.2/1999, p.1-9, 1999.

Zhang, z.; Marquardt, r. R.; Wang, g.; Guenter, w.; Crow, g. H.; Han, z.; Bedford, m. R. A simple model for predicting the response of chicks to dietary enzyme supplementation. *J. Anim. Sci.*, v.74, p.394-402, 1996.