

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 DA RESISTÊNCIA
A ANTIMICROBIANOS E DO COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO
DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*
ISOLADAS DE FRANGOS DE CORTE

Felipe de Oliveira Salle

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Orientador: Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

Porto Alegre

2009

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

UTILIZAÇÃO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL (REDES NEURAIAS
ARTIFICIAIS) PARA A CLASSIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA
A ANTIMICROBIANOS E DO COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO
DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*
ISOLADAS DE FRANGOS DE CORTE

Autor: Felipe de Oliveira Salle

Tese apresentada como requisito para a obtenção
do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de
Medicina Veterinária Preventiva, especialidade Sanidade
Avícola.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

Porto Alegre

2009

S168u Salle, Felipe de Oliveira

Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação da resistência a antimicrobianos de comportamento bioquímico de amostra de *Escherichia coli* isoladas de frango de corte./ Felipe de Oliveira Salle. – Porto Alegre: UFRGS, 2009.

88 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2009. Carlos Tadeu Pippi Salle, Orient.

1. Avicultura 2. Sanidade avícola 3. Redes neurais artificiais
4. *Escherichia coli*: aves de corte I. Salle, Carlos Tadeu Pippi, Orient.
II. Título

CDD 619.602605

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS



FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Nome do Autor: Felipe de Oliveira Salle

TÍTULO DO TRABALHO: UTILIZAÇÃO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL (REDES NEURAIS ARTIFICIAIS) PARA A CLASSIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E DO COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE FRANGOS DE CORTE

APROVADA EM: 29/05/2009

APROVADO POR:

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle
Orientador e Membro da Comissão

Prof. Dr. Adriano da Silva Guahyba
Membro da Banca

Prof. Dr. Benito Guimarães de Brito
Membro da Banca

Prof. Dr. Sérgio José de Oliveira
Membro da Banca

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em especial a minha filha Brenda, pessoa que me fez ter a força final para terminar a tese. Aos meus pais Rita e Tadeu, a minha irmã Fátima e a minha avó Thereza que participaram comigo nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e pai Carlos Tadeu Pippi Salle pela orientação, confiança, e pelos momentos de desconfiança (que me fizeram ter mais força durante os momentos mais difíceis), pela oportunidade única proporcionada, e pelos ensinamentos que estarão comigo para o resto da minha vida.

Aos doutores Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha, Hamilton Luiz de Souza Moraes e Vladimir Pinheiro do Nascimento pelo estímulo e pelas oportunidades que me deram durante todo o meu período de trabalho no laboratório e fora dele.

Aos colegas mestrandos e doutorandos do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Sílvio Luís da Rocha, pela solidariedade e os ensinamentos dentro da área de biologia molecular, Anderlise Borsoi, pelas dicas passadas dentro do setor de bacteriologia; Diana Giotto, pelo auxílio na preparação dos materiais e pelos momentos de descontração entre uma bateria de trabalho e outra; Flávia Fortes, pela atenção, dedicação, companheirismo e amizade durante a execução do trabalho como um todo; Francielli Zimmermann, pelo apoio, pela ajuda na coordenação do CDPA, além dos incentivos durante todo o período que estivemos trabalhando juntos no laboratório; Guilherme Fonseca de Souza e Lucas Brunelli de Moraes, pelo auxílio nos momentos de dificuldade, pela parceria e pelas de aprendizado na área avícola. Igualmente agradeço a eles pelos momentos lúdicos durante esses quatro anos, tanto na rotina laboratorial, como nos cursos ministrados pelo Brasil.

Aos funcionários Luiz Henrique (Zico), seu Omar e dona Dila pelo auxílio nessa realização. Aos estagiários do CDPA que estiveram prontos a cooperar nas tarefas ao longo desse período. Em especial à Caroline Hiller, colega, parceira exemplar, e que em todos os momentos, deixou bem explícito a sua competência, responsabilidade, e interesse para que esse trabalho fosse realizado. Mas não posso esquecer das duas estagiárias Daniela Pinheiro e Juliana Herpich, que sem elas essa tese não teria sido executada da maneira como foi.

E por última, mas não menos importante, agradeço à Amanda Amadio, mãe da minha filha Brenda, pela ajuda sempre quando foi possível para a feitura desta tese. Pelos momentos de alegria, e outros que exigiram que eu me desdobrasse em dois. Viver é aprender, e por isso, agradeço a ela, pelos ensinamentos que fizeram com que eu me tornasse uma pessoa melhor.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa que recebi durante o período de doutorado.

Agradeço por fim, a todos que de uma maneira ou outra me ajudaram e incentivaram na realização desta tese.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1. RESUMO..... | 8 |
| 2. ABSTRACT..... | 10 |
| 3. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 4. METODOLOGIA..... | 20 |
| 4.1. Estrutura da tese..... | 20 |
| 4.1.1. Introdução..... | 20 |
| 4.1.2. Trabalhos científicos..... | 20 |
| 4.1.3. Discussões | 21 |
| 5.1. Artigos..... | 22 |
| 5.1.1. Artigo 1..... | 22 |
| 5.1.2. Artigo 2..... | 31 |
| 5.1.3. Artigo 3..... | 48 |
| 5.1.4. Artigo 4..... | 60 |
| 5.1.5. Artigo 5..... | 75 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 80 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 85 |

1. RESUMO

O estudo foi feito através de um banco de registros de amostras de *Escherichia coli*, isoladas de frangos de corte. Na presente tese foram utilizadas 246 amostras do patógeno citado acima, com todas as características utilizadas em recentes trabalhos acadêmicos. Para a classificação das amostras utilizou-se a inteligência artificial, onde traçou-se uma interrelação entre as variáveis usadas: origem (lesões cutâneas, quadros respiratórios, cama), motilidade das amostras, lesões causadas (aerossaculite, pericardite, peritonite, periepatite, celulite), IP, genes (*cvaC*, *iss*, *iutA*, *falA*, *KpsII*, *papC*, *tsh*), 14 antimicrobianos (Amicacina, Amoxicilina e Ácido clavulânico, Ampicilina, Cefalexina, Cefuroxina, Ceftiofur, Ciprofloxacina, Clindamicina, Cotrimoxazol, Enrofloxacina, Gentamicina, Norfloxacina, Ofloxacina, Tetraciclina) e os bioquímicos variáveis (Adonitol, Ornitina, Arginina, Dulcitol, Salicina, Sacarose, Rafinose). No total foram feitas durante a tese em torno de 140 redes neurais, das quais foram utilizadas somente as que melhor apresentaram uma classificação correta e dentre estas as que continham um número menor de variáveis envolvidas. Durante o trabalho foram anexados 5 artigos científicos. Os artigos foram intitulados da seguinte maneira: Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* oriundas de camas de aviários, lesões de celulite e de quadros respiratórios de frangos de corte do Rio Grande do Sul; Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para classificar a resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango de corte; Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação do comportamento bioquímico 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; Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. Nos primeiro artigo observou-se uma multi-resistência a pelo menos duas das

14 drogas utilizadas. No segundo artigo citado, notou-se que dentre as amostras analisadas corretamente apresentaram uma porcentagem de 84% a 100% nas amostras intermediárias, 81% a 100% para as resistentes, 89% a 100% sensíveis. No terceiro trabalho, foi concluído que as redes feitas foram capazes de classificar corretamente as amostras com uma amplitude de 87,80% a 98,73%. Além disso, a sensibilidade e a especificidade das classificações obtidas variam de 59,32% a 99,47% e de 80,00% a 98,54%, respectivamente. No quarto artigo, seguindo a ordem descrita acima, as redes construídas que usaram 11 categorias dos índices de patogenicidade, apresentaram 54,27% de classificações corretas, no entanto quando foram usadas somente 3 categorias essa porcentagem subiu para 80,55%. Houve um aumento das classificações corretas para 83,96% quando as categorias foram apenas duas. No quinto artigo, foram usadas um total de 61 amostras de *Escherichia coli*, onde foram testadas a presença dos genes citados no início deste resumo, e houve uma presença de 73,8% do gene *iss*, 55,7% do *tsh*, 45,9% do *iutA*, 39,3% do *felA*, o *papC* apareceu em 24,3% das amostras, o *cvaC* em 23%, e por fim, o *kpsII* em 18%. Mais uma vez pode-se afirmar, que o uso das redes neurais artificiais cada mais, está servindo como uma ferramenta que dá um suporte científico para a tomada de decisão.

2. ABSTRACT

This study was made using a data bank with samples of *Escherichia coli*, isolated from broilers. In the present thesis, 246 samples of the mentioned pathogenic bacteria, which were cited above, with all the characteristics used in recent academic works. For the classification of the samples, artificial intelligence was used, and a correlation between the taken variables was established: origin (cutaneous lesions, lesions of poultry with respiratory signals, litter of poultry house), motility of the samples, injuries (aerosaculitis, pericarditis, peritonitis, periepatitis, cellulitis), PI, genes (*cvaC*, *iss*, *iutA*, *falA*, *KpsII*, *papC*, *tsh*), 14 antimicrobials (Amikacyn, Amoxicillin and clavulanic acid, Ampicilin, Cefalexin, Cefuroxime, Ceftiofur, Ciprofloxacin, Clindamycin, Cotrimoxazole, Enrofloxacin, Gentamycin, Norfloxacin, Ofloxacin, Tetracyclin) and the biochemical profile (Adonitol, Ornithine, Arginine, Dulcitol, Salicin, Sucrose, Raffinose). In this thesis, 140 neural networks were constructed, from which the ones that presented the best correct classifications, and the ones that used the lesser number of variables were chosen. Five scientific articles were annexed. The articles were entitled in the following way: Antimicrobial resistance of samples of *Escherichia coli* from litter of poultry house, cellulitis lesions, and lesions of poultry with respiratory signals in broilers of Rio Grande do Sul; The use of artificial intelligence (artificial neural networks) to classify the antimicrobial resistance isolated from samples of *Escherichia coli* in broilers; The use of artificial intelligence (artificial neural networks) to classify the biochemical profile of samples isolated from *Escherichia coli* in broilers; The use of artificial intelligence (artificial neural networks) to classify the pathogenicity of *Escherichia coli* isolates from broilers; Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. In the first article a multi resistance at least to two of the 14 used drugs was observed. In the second article, it was noticed that 84% to 100% were intermediate, 81% to 100% were resistant, and 89% to 100% were sensible. In the third work, it was concluded that the neural networks were able to classify correctly with an amplitude from 87.80% to 98.73%. Moreover, the sensitivity and the specificity of the gotten classifications vary from 59.32% to 99.47% and from 80.00% to 98.54%, respectively. In the fourth article, following the described order above, the constructed neural networks, which used 11 categories of the pathogenicity indices, presented 54.27% of correct classifications, when just 3 categories were used, the correct classification went up to 80,55%. There was an

increase in the correct classifications to 83.96% when the categories were only two. In the fifth paper, it was used a total of 61 samples of *Escherichia coli*, and tested the presence of the cited genes at the beginning of this summary, and the presence was 73.8% of the gene *iss*, 55.7% of *tsh*, 45.9% of *iutA*, 39.3% of *felA*, *papc* appeared in 24.3% of the samples, *cvaC* in 23%, and finally, *kpsII* in 18%. One more time, it can be affirmed that the use of artificial neural networks is serving as a tool to provide a scientific support for the decision making.

3. INTRODUÇÃO

A avicultura ocupa uma posição de destaque no agronegócio brasileiro. A Associação Brasileira de Exportadores de Frango (ABEF) fornece dados que sustentam essa afirmação. Segundo esse órgão associativo, houve um aumento nas exportações de 8% no ano de 2008, o que acabou acarretando um contínuo trabalho de promoção do frango brasileiro. A importância social do segmento é reconhecida ao tornar viável o minifúndio e fixar o homem no campo. Estes fatos reduzem os cinturões de miséria dos grandes centros urbanos, originados, fundamentalmente, pela desesperança e desilusão dos agricultores refletindo-se de modo positivo na diminuição da criminalidade. Esta última, uma das maiores preocupações do cidadão brasileiro. (ABEF, 2006)

Os mercados mundiais no ano de 2007 tiveram uma recuperação significativamente favorável para a produção avícola das Américas (houve um aumento de 5%), o que acabou proporcionando expressivos crescimentos na produção. Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela chegaram a atingir 36,48 milhões de toneladas, ultrapassando 50% da produção de carne de frango no mundo inteiro. No Brasil houve uma manutenção do consumo *per capita* acima de 37,8 kg por habitante/ano. Os países que mais produziram foram os Estados Unidos, Brasil e México, com 16,8 milhões de toneladas, 10,25 milhões de toneladas (um crescimento de 9,75% sobre o ano anterior, com abates girando em torno de 4,84 bilhões de cabeças) e 2,66 milhões de toneladas, respectivamente. Para o mercado interno esperava-se para o ano de 2008 uma evolução de 4% a 5%, baseado na melhoria de renda do brasileiro e, também, no crescimento demográfico da nossa população (UBA, 2009).

O Rio Grande do Sul ocupa a terceira posição entre os estados produtores e exporta cerca de 600 mil toneladas, ou 28% da sua produção. A Associação Gaúcha de Avicultura (ASGAV) informa que no Estado existem 16 frigoríficos com Inspeção Federal e 5 com Inspeção Estadual (totalizando 21 plantas de processamento). Toda a estrutura que envolve a avicultura é responsável por 45 mil empregos diretos e 850 mil indiretos, 11 mil produtores integrados, com um plantel permanente de mais de 60 milhões de pintos de corte e 2,5 milhões de avós/matrizes/poedeiras comerciais (ASGAV, 2006). O início do consumo de carne de frango deu-se há 8.000 anos quando houve a domesticação das espécies *Gallus gallus* pelas populações asiáticas. Dessa região, através de movimentações nômades, a produção e domesticação das galinhas passou pela Turquia, até chegar na Europa durante a Idade do Ferro (nessa época as galinhas primitivas punham em torno de 30 ovos por ano) e de lá, para o Brasil, através

dos imigrantes. No século 19 a produção avícola propriamente dita começou no Brasil, e com o desenvolvimento dos criatórios industriais a produção passou a ser em grande escala. Na década de 30 houve a importação das primeiras incubadoras elétricas, principalmente pelo Estado de São Paulo, alavancando as cooperativas, destacando assim a região pela sua avicultura de corte. Há apenas 40 anos, a avicultura brasileira deixava de ser uma atividade de fundo de quintal e tinha opções negociadas nas bolsas de valores. É o resultado da implantação constante de tecnologia, principalmente de origem externa, no entanto, a incorporação da tecnologia externa, muitas vezes, foi feita sem uma reflexão mais aprofundada para definir sua adaptação às necessidades locais.

Portanto, claramente foi pouco cultivado o espírito de desenvolvimento científico e tecnológico nas empresas brasileiras, o que deixou em segundo plano os projetos de cooperação entre as instituições de ensino e pesquisa e as empresas avícolas, com flagrantes prejuízos para o desenvolvimento setorial, sem falar na renúncia constante aos recursos oficiais destinados a promover este tipo de integração. Um simples levantamento no número e na qualidade das pesquisas internacionais, principalmente nos Estados Unidos da América e no Reino Unido, na área avícola, realizadas nos últimos 40 anos, demonstrará que, entre outros temas, foi desenvolvida a vacina contra a doença de Marek, um tipo de câncer linfático das aves. Esta vacina, utilizada maciçamente nos plantéis avícolas desde o início da década de 70, foi a primeira vacina realmente eficaz contra esta terrível enfermidade, e se constitui num atestado de excelência científica. Por outro lado, neste mesmo período de tempo, os resultados são pouco expressivos, no que diz respeito a vacinas aviárias desenvolvidas no Brasil, as linhagens genuinamente brasileiras competitivas comercialmente, ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, e novas drogas medicamentosas amparadas na pesquisa local.

Cabe destacar a desproporção entre a dimensão da avicultura industrial brasileira e a capacidade instalada nas instituições de ensino e de pesquisa do nosso País para promover a renovação tecnológica referida anteriormente. Esta é a maior evidência da nossa fragilidade, quando comparada com nossos competidores. A timidez da pesquisa na área, principalmente naquela que se transformou no calcanhar de Aquiles, a sanidade avícola, é a maior ameaça à manutenção dos mercados atuais ou à conquista de novos.

Sabe-se que os países que investem os maiores percentuais do PIB e cultivam a parceria entre universidade e empresa, na geração do conhecimento, são os mais ricos do mundo. E são eles os nossos maiores rivais.

Esta visão crítica, sem querer desestimular o espírito, serviu como estímulo para a busca de novas alternativas para melhorar o gerenciamento da produção avícola. Desta forma já foram desenvolvidos no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), projetos de pesquisas, sob a forma de teses de doutorado e de dissertações de mestrado, que utilizaram inteligência artificial, especificamente redes neurais artificiais (RNA), para o gerenciamento da produção de reprodutoras pesadas, da produção de frangos de corte, para explicar os fenômenos envolvidos no incubatório, relacionar índices de patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* aos fatores de virulência, analisar os acontecimentos no setor de abatedouro, além de utilizar as RNA como uma ferramenta para auxiliar no diagnóstico de análise de imagem, todos trabalhos apresentando excelentes resultados.

Primeiramente foi Roseblatt (1958), quem descreveu o perceptron que é, na verdade, um modelo computacional inspirado no neurônio humano e precursor das redes neurais artificiais.

As redes neurais foram inspiradas na estrutura e na função de neurônios biológicos. Redes neurais “aprendem” ajustando as interconexões dos pesos entre as camadas de neurônios. As respostas obtidas são, repetidamente, comparadas com as respostas corretas e, em cada vez, os pesos das conexões são ajustados ligeiramente na direção da resposta correta. São adicionados tantos neurônios escondidos quantos forem necessários para a maior precisão da resposta. A rede neural artificial é um conjunto de unidades processadoras (ou nódulos) que simulam os neurônios biológicos e são interconectados por um conjunto de pesos (análogo às conexões sinápticas no sistema nervoso), o qual permite tanto processamento serial quanto paralelo de informações através da rede. (ASTION; WILDING, 1992; ROUSH, 1996; XIN, 1999). Os “neurônios” da rede podem receber importância relativa das entradas excitatórias ou inibitórias de outros neurônios. (FORSSTRÖM; DALTON, 1995). Os neurônios produzem uma saída, que geralmente é uma função não linear da entrada da rede. (ASTION; WILDING, 1992). Em contraste com muitos sistemas especialistas, as redes neurais artificiais não dependem de algoritmos pré-definidos. (LEE et al., 1999).

Kovács (1996), escreveu que fenômenos complexos têm sido uma área fértil para o desenvolvimento de modelos com redes neurais. A complexidade reside em envolver várias variáveis com causas inter-relacionadas e dependentes, mas que não podem ser explicadas por uma relação linear ou não linear do tipo polinomial de

primeira ordem. Redes neurais, mesmo que implementadas com sucesso, permitem apenas simular ou emular o fenômeno modelado, não oferecendo por si só a possibilidade de se simplificar, generalizar ou reduzir a teoria por trás do fenômeno em estudo. Neste sentido, podem ser consideradas como uma panacéia pragmática que funciona, mas não se conhece o porquê.

Anteriormente, Forsström; Dalton (1995) afirmaram que à medida que o aprendizado ocorre, o erro entre a saída da rede e a saída desejada diminui. Então, o conhecimento, o qual a rede aprende, está codificado nos pesos das conexões entre neurônios. Devido ao fato de tal conhecimento estar distribuído através dos pesos, é quase impossível interpretar (no sentido de detalhar) o conhecimento adquirido por qualquer rede de retropropagação. Por esta razão, as redes neurais são frequentemente chamadas de “caixas pretas”. Elas aprendem a calcular uma saída corretamente a partir de um padrão de entrada, mas dificilmente revelam, sob qualquer forma compreensível, o que as levou a tais julgamentos. Assim, sendo, os mesmos autores enumeram as vantagens e as desvantagens das redes neurais artificiais, as quais são transcritas a seguir.

Vantagens:

- Os cálculos são feitos em neurônios individuais;
- Permitem execução de tarefas muito mais complexas para serem aprendidas de exemplos de dados, do que técnicas de estatística convencional;
- Dados qualitativos e quantitativos facilmente podem ser incluídos no mesmo modelo;
- Não há necessidade de transformação de dados, como é necessário em algumas ocasiões, quando a estatística é utilizada, já que os dados usados na rede não tem que ir ao encontro de quaisquer suposições de distribuição de dados, pois não se exige homocedasticidade;
- São particularmente ajustadas à análise de dados não lineares e multivariados e, como é sabido, a maioria dos fenômenos biológicos não se comporta de forma linear, ou seja, como uma simples reta (devido à enorme complexidade e inter-relação entre quaisquer variáveis sob estudo).

Desvantagens:

- O conhecimento aprendido não pode ser expresso em regras, ou seja, não existe uma equação inteligível que possa ser mostrada;
- A validação da rede é mais difícil do que em estatística convencional;

- As redes neurais precisam de muitos exemplos para serem adequadamente treinadas e validadas.

A utilização das redes neurais artificiais tem sido intensa e variada. Podem servir para classificar e reconhecer padrões; reconhecer e gerar fala; otimizar processos químicos; prever índices financeiros, tais como: taxas de câmbio de moeda; reconhecer e localizar minas militares; localizar a origem de pontos no radar; identificar células cancerosas; reconhecer anormalidades cromossômicas; detectar alterações cardíacas; prever trajetórias de re-entrada de naves espaciais; reconhecer automaticamente caracteres escritos à mão; entre outros (CHENG; TITTERINGTON, 1994).

Segundo Flock (2009), a avicultura mundial apresentará um crescimento significativo nos próximos 25 anos. O potencial genético encontrado na produção avícola continuará aumentando as taxas de competitividade se comparado à outras fontes protéicas para o consumo humano. Não há risco dessa variabilidade genética (potencial genômico) ser exaurida durante esse período, já que há uma grande base genética nos cruzamentos comerciais atuais. A tendência para que ocorra uma superprodução é similar ao crescimento em níveis globais, com isso produtores devem manter uma pressão para que possam cortar custos, e que continuem a produção. Enquanto consumidores poderão escolher entre uma variedade de produtos avícolas analisando o custo x benefício.

De acordo com Peric (2009), criadores de frangos de hoje buscam aliar a produção de uma ave ideal com empresas reprodutoras e, com isso, garantir o sucesso dos seus empreendimentos. Os objetivos são principalmente manter ou até aumentar o mercado mundial com uma alta produtividade. No entanto para que seja mantido esse alto desempenho, a qualidade sanitária dos plantéis deve ser minuciosamente planejada, observando possíveis patógenos tais como a *Escherichia coli*, que mesmo fazendo parte do trato intestinal pode vir a ser patogênica, favorecendo doenças sistêmicas. (GROSS, 1994).

A *E. coli* patogênica aviária (APEC) pertence ao grupo patogênico de *Escherichia coli* extra-intestinal. A APEC igualmente está associada à celulite. (MELLATA et al., 2003). As cepas na maioria das vezes são associadas à infecções do tecido extra-intestinal de galinhas, perus, patos e outras espécies aviárias. A infecção inicial normalmente ocorre no trato respiratório e resulta numa variedade de doenças as quais são responsáveis por severas perdas econômicas, com uma mortalidade de até

20%, e uma redução de crescimento e da conversão alimentar, além de aumentar a taxa de condenação no abatedouro. As infecções são secundárias à infecção inicial do trato respiratório superior por micoplasmas ou quando existem associações de um agente viral, o que pode acabar ocasionando aerossaculite, onfalite, septicemia, celulite e síndrome da cabeça inchada (SHS). (STEHLLING et al., 2003).

Um importante passo no processo de infecção é a aderência das cepas de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) ao epitélio da traquéia. Isso acaba permitindo que a bactéria tenha uma resistência sobre o mecanismo de defesa (camada mucosa da traquéia) conseguindo a sua colonização. (VANDEMAELLE et al., 2003). A susceptibilidade das aves frente às infecções das APEC aumenta conforme ocorre a degeneração dos cílios das células epiteliais do trato respiratório superior seguido de uma exposição à amônia e à poeira encontrada no ambiente em que as aves se encontram. Uma infecção no trato respiratório acaba resultando em depressão, febre e morte. A contaminação das aves com *Escherichia coli* ocorre nas primeiras horas que seguem a postura, sendo que as cepas contaminantes rapidamente multiplicam-se no intestino. Várias cepas diferentes podem ser adquiridas durante a vida da ave. Contaminações verticais resultam na transmissão da *E. coli* das reprodutoras, via casca contaminada na postura, o que acaba resultando na inflamação do saco da gema da prole. Contaminações horizontais com *E.coli* usualmente ocorrem através do contato com outras aves, através das fezes, água contaminada, e comedouros. Aves são freqüentemente contaminadas através da inalação de partículas presentes na poeira que podem conter 10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de bactéria por grama de fezes. (DHO-MOULIN et al., 1999).

As cepas isoladas de *E.coli* oriundas de animais e humanos são caracterizadas pela grande variedade de patótipos, com vários genes comuns o que acaba sugerindo que ocorra uma troca genética entre essas cepas, e isso acaba proporcionando um aumento na probabilidade de uma nova cepa emergente. Embora a virulência bacteriana seja constituída de vários fatores, o emprego da *E.coli* comensal como um indicador de contaminação é de suma importância na resistência ou no aumento do número de fatores de virulência associados a este patógeno, podem servir como um sistema de alerta para o surgimento da resistência e virulência em bactérias potencialmente patogênicas. (IKUNO et al., 2006). As cepas de *Escherichia coli* patogênicas aviárias pertencem predominantemente aos sorogrupos O1, O2, O5, O8, O18, e O78. A presença de vários genes conhecidos como virulentos vêm sendo ligados positivamente à patogenicidade

das cepas de APEC. Várias adesinas e o gene *tsh* são freqüentemente encontrados em cepas patogênicas isoladas. (GERMON et al., 2005). Nos últimos 60 anos as bactérias, em especial as patogênicas para humanos, desenvolveram uma resistência para drogas antimicrobiais. Esta evolução tem 2 passos: surgimento de novas cepas emergentes e disseminação da resistência. Cepas emergentes podem ser o resultado das mutações nas estruturas nativas ou genes regulatórios ou adquiridos a partir de uma informação genética de fora. No entanto, muito tem sido feito para atrasar esse subsequente avanço da resistência microbiana. (QUINTILIANE; COURVALIN, 1995).

Técnicas para prevenir e controlar as infecções causadas pelas APEC na indústria avícola incluem a melhora nos métodos de higiene, vacinação, uso de produtos competitivos de exclusão, e a introdução de novos imunopotenciadores. No entanto, essas práticas tem um sucesso limitado e isso acaba fazendo com que seja necessário o uso de terapias com antimicrobianos para controlar surtos de colibacilose. Recentes estudos descrevem um aumento da resistência destes antimicrobianos usados no tratamento. Fluorquinolonas são antimicrobianos eficazes na medicina humana e vem comprovando a sua eficiência contra certos agentes patógenos de doenças em animais. Entretanto, um número crescente de estudos tem reportado que existe uma associação entre as cepas emergentes que são resistentes à fluorquinolonas, como a *Samonella*, *E.coli* e *Campylobacter* e o uso destes antimicrobianos na medicina veterinária. Atualmente, existe um pequeno banco de dados com informações sobre a epidemiologia, a prevalência e os mecanismos de resistência dos patógenos. (ZHAO et al., 2005). As fluorquinolonas são uma nova classe de antimicrobianos que apresentam uma ação excelente contra bacilos gram negativos. (BLANCO et al., 1997). Esse tipo de antimicrobiano age através da inibição das enzimas topoisomerase bacteriana, também conhecidas como DNA girase (topoisomerase bacteriana I e topoisomerase IV) o que acaba acarretando uma alteração da fita de DNA e em seguida a morte celular. (DRLICA, 1997; EVERETT; PIDDOCK, 1998; HOOPER, 1999; QUINTILIANE; COURVALIN, 1995; ZHAO, 2005).

Contudo animais doentes são, poucas vezes, tratados individualmente, mas com freqüência lotes inteiros são medicados de uma só vez, o que acaba incluindo os animais que não estão doentes. Além disso, antimicrobianos são usados na ausência da doença a fim de prevenir enfermidades durante os períodos que os animais são mais susceptíveis às infecções. Essa prática é muito comum em países onde as infecções são causadas por cepas patogênicas entéricas, o que acaba sendo severo para a avicultura e a suinocultura

dessas áreas. Granjas avícolas normalmente usam ciprofloxacina, penicilina, estreptomicina, no tratamento de lotes infectados. (YANG et al., 2004). Sabe-se que as cepas comensais de *Escherichia coli* próprias de animais já apresentam uma certa resistência aos antimicrobianos usualmente utilizados, tais como: carbenicilinas, sulfametoxazole, ampicilina e estreptomicina. (KANG et al., 2005).

Outro mecanismo de resistência antimicrobiana ocorre com as tetraciclinas, onde há uma penetração celular através do mecanismo de difusão passiva. Ocorre uma inativação da síntese protéica na subunidade da unidade ribossomal 30S. (FLUIT et al., 2001). Uma das características próprias das bactérias é apresentar uma resistência antimicrobiana quando ocorre uma aquisição de genes para efetuar tal atividade ou uma mutação ao acaso. Essa mudança genética pode ser feita através de mecanismos tais como: conjugação, transformação ou tradução e acabam proporcionando à bactéria que a mesma sintetize enzimas capazes de desestruturar a composição dos antimicrobianos, ou mesmo capacitar sistemas de proteção que impeçam que a química dos antimicrobianos seja eficaz, mudando por vezes o alvo de ação ou alterando a rota metabólica. (McMANUS, 1997). Essas mutações através da modificação de porinas (estruturas que permitem o transporte de nutrientes, íons e alguns resquícios de antimicrobianos, tais como β -lactâmicos e tetraciclinas entre as membranas bacterianas) localizadas na membrana externa das bactérias gram negativas, acabam afetando a virulência e a resistência à antimicrobianos. (DOSS, 1994).

4. METODOLOGIA

4.1. Estrutura da tese

4.1.1. Introdução

Será apresentada uma breve visão geral do panorama da avicultura frente aos numerosos estudos feitos sobre a colibacilose, preocupações e possíveis soluções quando há a implantação de novas ferramentas, no caso redes neurais artificiais estabelecendo padrões juntamente com as técnicas de reação de polimerase (PCR), e a resistência de certas amostras de *Escherichia coli*, frente a antimicrobianos que atualmente estão sendo utilizados. Cada um dos artigos anexados à tese abordará assunto específico e apresentará a bibliografia correspondente.

4.1.2. Trabalhos científicos

4.1.2.1. Artigo 1

“Resistência a antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* oriundas de camas de aviários, lesões de celulite e de quadros respiratórios de frangos de corte do Rio Grande do Sul.”

A ser enviado para publicação

4.1.2.2. Artigo 2

“Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para classificar a resistência a antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte.”

A ser enviado para publicação

4.1.2.3. Artigo 3

“Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação do comportamento bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte.”

Publicado em: Acta Scientiae Veterinariae, v.37, n.3, 2009.

4.1.2.4. Artigo 4

“The use of artificial intelligence (artificial neural networks) to classify the pathogenicity of *Escherichia coli* isolates from broilers.”

A ser enviado para publicação

4.1.2.5. Artigo 5

“Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry.”

Publicado: Pesquisa Veterinária Brasileira. v.28, n.3, p. 183-186. 2008

4.1.3. Discussão

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

5.1 Artigos

5.1.1. Artigo 1

Resistência a antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* oriundas de camas de aviários, lesões de celulite e de quadros respiratórios de frangos de corte do Rio Grande do Sul.

Felipe de Oliveira Salle¹; Flávia Bonarcini Borges Fortes¹; Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha²; Silvio Luis da Silveira Rocha¹, Caroline Carniel Hiller¹, Hamilton Luiz de Souza Moraes¹, Diana Bertani Giotto¹, Carlos Tadeu Pippi Salle¹

¹ 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

² Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brasil

RESUMO

A colibacilose é enfermidade causada pela bactéria *Escherichia coli* que é habitante comum das granjas avícolas e freqüentemente infecta as aves industriais e, assim, pode causar a doença de forma primária ou associada a outro agente etiológico. Foi estudada a resistência antimicrobiana de 246 amostras de *Escherichia coli* oriundas de cama de aviários, de lesões de celulite e de lesões respiratórias de frangos de corte frente a 14 antimicrobianos. Os resultados revelaram percentual de resistência com amplitude de 1,63% para amicacina a 92,68% para clindamicina, com média de 24,68%. Todas as amostras foram multi-resistentes, ou seja, apresentaram resistência a mais de duas das 14 drogas utilizadas. O experimento também demonstrou que não houve diferença significativa entre as médias dos índices de patogenidade das amostras de *Escherichia coli* intermediárias, sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos usados neste experimento.

ABSTRACT

Colibacillosis is a disease caused by *Escherichia coli* a common inhabitant of the poultry farms and often infect the birds causing primary or secondary illness when associated with another aetiologic agent. Antimicrobial resistance of 246 *E. coli* isolated from chickens originated from litter, lesions of cellulitis and lesions of the respiratory tract were studied. The results showed resistance with amplitude of 1,63% to amikacin 92,68% to clindamycin, with 24,68% average. Resistance to two or more antibiotics was

observed among all *E. coli* isolates. The experiment also demonstrated that had no significant difference among the averages of the Pathogenicity Index of the isolates that were intermediate, sensible or resistant to antimicrobials used in this experiment.

INTRODUÇÃO

A colibacilose é enfermidade causada pela bactéria *Escherichia coli* que é habitante comum das granjas avícolas e freqüentemente infecta as aves industriais e, assim, pode causar a doença de forma primária ou associada a outro agente etiológico.

A história nos revela que o uso de antibióticos nas rações animais foi iniciado na década de 1950 com o objetivo de melhorar o ganho de peso e o índice de conversão alimentar. Em 1973, os Estados Unidos da América produziram quatro milhões de quilogramas de antibióticos para uso em animais e outros usos não médicos, enquanto para emprego em medicina humana foram fabricados seis milhões de quilogramas, embora desde 1955 muitos cientistas já alertassem para os benefícios e os riscos deste tipo de procedimento. (KISER, 1976). Os riscos identificados na década de 1970 estavam relacionados à saúde humana, à saúde animal e à eficácia do uso medicamentoso de antibióticos nos animais. A preocupação era devida ao uso de subdosagens, ou doses menores que a terapêutica, para controle de *Salmonella* e como a suscetibilidade a estes antibióticos pelos coliformes dos animais seria refletido na saúde pública e da sanidade animal. (SOLOMONS, 1978). Desde então a literatura retrata, fartamente, que a preocupação só aumentou.

Estudos realizados na Arábia Saudita mostraram que a resistência a drogas múltiplas era maior nas *Escherichia coli* isoladas nos frangos do que nas infecções humanas, razão pela qual os autores recomendavam o banimento dos antibióticos como promotores de crescimento na avicultura. (AL GHAMDI et al., 1999). Contrastando com esta opinião, recentemente foi estudada a presença de genes associados a resistência antimicrobiana em granjas canadenses. Os autores usaram bacitracina de zinco e virginiamicina e verificaram que os promotores de crescimento pareciam diminuir a porcentagem de *E.coli* resistente a alguns agentes bacterianos, quando se usam os genes associados à resistência antimicrobiana *vatD* e *bcrR* como indicadores do fenômeno. (THIBODEAU et al., 2008).

As enzimas β -lactamases de largo espectro são enzimas bacterianas que degradam as cefalosporinas como a cefotaxima e a ceftadizima. Uma destas enzimas é a CTX-M que foi estudada no Reino Unido e, através da sua presença, foi demonstrado

que somente uma amostra, entre as 62 oriundas dos animais criados naquele país apresentava a enzima CTX-M-1, enquanto os produtos brasileiros comumente apresentavam a enzima CTX-M-2. Os autores concluem que diversas amostras de *E. coli* resistentes às quinolonas com vários genes CTX-M β -lactamases, associados a infecções intestinais no homem, estavam presentes em cortes de peito dos frangos importados do Brasil. (WARREN et al., 2008)

A resistência antimicrobiana é uma das maiores preocupações para a saúde pública. Bactérias tidas como comensais são um importante reservatório para a indução de resistência aos antimicrobianos mais antigos. Experimentos demonstraram alta resistência (63,2%) de *E. coli* provenientes de granjas avícolas sérvias a tetracilinas, estreptomicina, ácido nalidíxico e ampicilina. (KNEZEVIC; PETROVIC, 2008). Estudo similar foi conduzido na China no período de 2001 a 2006 e houve alta resistência aos antibióticos estudados. As amostras de *E. coli* revelaram alta resistência a ampicilina (80,2%), doxiciclina (75%) e enrofloxacina (67,5%). Por outro lado, as resistências para cefalotina (32,8%), cefazolina (17%) e amicacina (6,5%) foram consideradas relativamente baixas. No mesmo trabalho, está escrito que ocorreu alta resistência ao florfenicol e que esta característica estava associada, principalmente, à presença do gene *florR*. (DAI et al., 2008). Ensaio de campo realizados em Portugal demonstraram que ao se tratar 16.000 frangos de corte de maneira seqüencial, durante o período de crescimento, com doses menores que a terapêutica e com três antibióticos diferentes causou um dramático aumento nos níveis de resistência e diversidade no fenótipo das amostras de *Escherichia coli* presentes nos pintos (DA COSTA et al, 2008).

Experimentos conduzidos no Vietnã estudaram a presença de fatores de virulência e de resistência antimicrobiana de 180 amostras de *E. coli* isoladas de matéria-prima de rações, frangos de corte, farinha de ostras e fezes de frangos. Os resultados apresentados demonstraram que as resistências mais freqüentes foram para tetracilinas (77,8%), sulfafurazole (60,6%), ampicilina (50,5%), amoxicilina (50,5%), trimetropina (51,5%), cloranfenicol (43,4%), estreptomicina (39,4%), ácido nalidíxico (34,3%) e gentamicina (24,2%). Além disto, as amostras isoladas de frangos de corte mostraram resistência para as fluorquinolonas assim distribuídas: ciprofloxacina 16,2%, norfloxacina 17,2% e enrofloxacina 21,2%. Os autores foram além e caracterizaram 58 genes associados à virulência, entre eles *papC*, *cvaC*, *fimH*, *iutA*, *iss*. (VAN et al, 2008).

Estudos epidemiológicos efetuados em Minnesota e Wisconsin, Estados Unidos da América, evidenciaram que o hábito de comer carne avícola não era fator de predição da ocorrência de *E. coli* resistentes em pacientes hospitalizados naqueles estados, quando comparado com outros de hábitos vegetarianos. (SANNES et al., 2008). Com a intenção de responder a pergunta se a avicultura orgânica é mais saudável do que a industrial, foram pesquisadas 55 amostras de carne avícola orgânica e 61 do produto industrial em relação a resistência bacteriana. Os produtos orgânicos revelaram que as amostras de *E. coli* isoladas possuíam menores níveis de resistência a sete dos dez antimicrobianos usados no experimento. (MIRANDA et al., 2008).

Em uma revisão sobre a resistência à antimicrobianos apresentada por dezenas de amostras de *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Escherichia coli* em vários locais do mundo Gyles (2008) conclui que a dinâmica da transmissão da resistência às drogas antimicrobianas e a evolução das populações de bactérias que estão aumentando esta resistência são muito complexas. A transmissão dos genes que promovem a resistência às drogas é facilitada por inúmeros fatores (seleção através do uso de antibióticos nos animais e no homem, produção animal em larga escala, processamento e distribuição dos alimentos, ausência de regulamentos ou tolerância em alguns países) e se constituem nos maiores fatores para a disseminação de populações bacterianas com alta frequência de resistência aos antimicrobianos. A indução de resistência parece ser mais complexa do que se imagina, pois foram isoladas amostras de *E.coli* de aves oriundas do Ártico, região de baixa pressão para a indução de resistência, nas quais foi relatada a resistência a 14 dos 17 antibióticos usados no experimento. (SJOLUND et al., 2008).

MATERIAL E MÉTODOS

No experimento utilizou-se 246 amostras de *Escherichia coli* (estocadas à -20°C em uma solução de 20% de glicerol), conforme as normas do National Committee of Laboratory Standards (NCCLS, 2003), oriundas de camas de aviários (coletadas no ano de 2002 a partir de galpões) lesões de celulite (que foram isoladas após o abate dos frangos) e as lesões de aves que apresentavam quadros de doenças respiratórias (estas amostras foram isoladas e identificadas no local onde foi feito o restante deste experimento, o Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA). As amostras foram retiradas do freezer, e repicadas em 5mL de BHI (Brain Heart Infusion), um meio não seletivo com o auxílio de uma alça de platina. Depois foram incubadas em

uma estufa à 37°C por 24 horas e, feito isso, os inóculos foram plaqueados e reincubados à 37°C por mais 24 horas. Os meios usados nessa etapa foram o EMB (Eosine Metilene Blue) um meio de cultura seletivo, onde as colônias produzidas apresentam um diâmetro de 2 a 3 mm, com um centro escuro, possuindo, ou não, um brilho metálico e o BHA (Brain Heart Agar) que é um meio não seletivo, onde as colônias se apresentaram circulares e esbranquiçadas. O passo seguinte, após as 24 horas de incubação, foi selecionar algumas colônias isoladas e repassá-las a um tubo de 5mL de solução salina 1%, através de uma homogeneização com o uso do Vortex, até atingir a concentração de 0,5 na escala McFarland. Com essa concentração estimou-se que existiam de 1 a 2 x 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL de *Escherichia coli* (ATTC25922). Conferida essa concentração, procedeu-se a realização de testes de susceptibilidade a antimicrobianos. Com o auxílio de uma pipeta, colocou-se o inóculo em placas que continham o meio de cultura Müller-Hinton e esse conteúdo foi espalhado de forma uniforme com uma alça de Drigalsky previamente esterilizada. Esse procedimento foi feito com todas as 492 placas de petry (duas placas por amostra) com 14cm de diâmetro que foram previamente preparadas para tal uso. O próximo passo, foi a colocação dos discos antimicrobianos na superfície das placas de Ágar Müller-Hinton (que já continham as amostras semeadas) com a ajuda de uma pinça estéril. Cada placa utilizada conteve 7 discos distribuídos uniformemente obedecendo a gabarito com as localizações previamente determinadas e numa distância (mínima de 2cm) para que não houvesse uma sobreposição de halos. Essas placas foram incubadas à 37°C por 24 horas. Para a realização dos testes foram utilizados 14 distintos antimicrobianos: amicacina, amoxicilina/ácido clavulâmico, ampicilina, cefalexina, cefuroxina, ceftiofur, ciprofloxacina, clindamicina, cotrimoxazol, enrofloxacina, gentamicina, norfloxacina, ofloxacina, e tetraciclina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Resistência(%) a antimicrobianos de 246 amostras de *Escherichia coli* isoladas de cama, lesões de celulite e quadros respiratórios de frangos de corte.

| Antimicrobiano | Intermediária (%) | Resistente (%) | Sensível (%) |
|---------------------------|-------------------|----------------|--------------|
| AMICACINA | 1,22 | 1,63 | 97,15 |
| AMOXILINA/ÁC. CLAVULÂNICO | 1,22 | 2,44 | 96,34 |
| AMIPICILINA | 4,47 | 29,27 | 66,26 |
| CEFALEXINA | 2,03 | 7,72 | 90,24 |
| CEFUROXIMA | 2,03 | 2,85 | 95,12 |

| | | | |
|----------------|-------|--------------|-------|
| CEFTIOFUR | 6,10 | 2,85 | 91,06 |
| CIPROFLOXACINA | 9,35 | 27,24 | 63,41 |
| CLINDAMICINA | 4,88 | 92,68 | 2,44 |
| COTRIMOXAZOL | 2,03 | 51,22 | 46,75 |
| ENROFLOXACINA | 18,29 | 28,86 | 52,85 |
| GENTAMICINA | 0,00 | 20,33 | 79,67 |
| NORFLOXACINA | 9,35 | 14,23 | 76,42 |
| OFLAXACINA | 8,54 | 13,82 | 77,64 |
| TETRACICLINA | 1,22 | 50,41 | 48,37 |

As 246 amostras de *Escherichia coli* submetidas a antibiogramas frente a 14 antimicrobianos revelaram percentual de resistência com amplitude de 1,63% a 92,68%, com média de 24,68%.

Os resultados obtidos no presente trabalho se assemelham a outros encontrados na literatura. Em razão da contínua mudança observada na resistência antimicrobiana da *E. coli* no decorrer do tempo a comparação se restringirá às publicações disponíveis do ano de 2008. Fato marcante é que todas as amostras foram resistentes a mais de dois antimicrobianos, circunstância também observada por Sjolund et al., (2008) em aves do Ártico e por Knezevic et al., (2008). Note-se que as aves silvestres do Polo Norte estudadas por eles não sofrem as pressões para a indução de resistência. Tanto lá como no presente experimento, os animais apresentaram resistência a ampicilina, tetraciclina e ciprofloxacina. Infelizmente, Sjolund et al., (2008) não especificaram os percentuais de resistência observados.

Knezevic, Petrovic (2008), trabalhando na Sérvia, não evidenciaram resistência para amicacina e o percentual de resistência para esta droga (1,63%) observada no nosso experimento está muito próximo da observação dos sérvios e é menor do que os resultados relatados na China. (DAI et al., 2008). Por outro lado, obteve-se 20,33% de resistência à gentamicina, enquanto que os vietnamitas observaram 24,2% Van et al., (2008) e as amostras sérvias eram totalmente sensíveis a este antimicrobiano. A resistência à ciprofloxacina foi de 27,4% nas amostras aqui estudadas. Este percentual é três vezes maior que o observado no experimento sérvio que reporta resistência de 7,9%. Em contraste com esta situação está a enrofloxacina cujas amostras foram resistentes na China em 67,5% e são superiores ao dobro da aqui observada (28,86%) A resistência para a ampicilina foi de 29,27%. Esse percentual foi inferior ao dos sérvios (44,7%), ao dos chineses (80,2%) e ao dos vietnamitas (50,5%).

A tetraciclina é dos antimicrobianos mais antigos entre os participantes dos diversos experimentos relatados. A resistência a essa droga foi de 50,41% no presente experimento, enquanto os chineses relataram 81,7% de amostras resistentes e os vietnamitas, 77,8%. Por outro lado, os sérvios não encontraram nenhuma amostra resistente à tetraciclina.

Cabe registrar a alta resistência das amostras para a clindamicina (92,68%). Na literatura consultada não foi encontrado testes com este antimicrobiano para que se pudesse fazer algum tipo de comparação.

Finalmente, as amostras intermediárias, resistentes e sensibilidade aos antimicrobianos estudados não apresentaram diferença significativa entre as médias dos seus índices de patogenicidade, com um nível de significância de 95%. (SOUZA, 2006).

CONCLUSÃO

As 246 amostras de *Escherichia coli* submetidas a antibiogramas frente a 14 antimicrobianos revelaram porcentual de resistência com amplitude de 1,63% para amicacina a 92,68% para clindamicina, com média de 24,68%. Todas foram multi-resistentes, ou seja, apresentaram resistência a mais de duas das 14 drogas utilizadas.

O experimento demonstrou que as amostras intermediárias, resistentes e sensibilidade aos antimicrobianos estudados não apresentaram diferença significativa entre as médias dos seus índices de patogenicidade, com um nível de significância de 95%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL GHAMDI, M.S.; EL MORSY, F.; AL MUSTAFA, Z.H.; AL RAMADHAN, M.; HANI, M. Antibiotic resistance of Escherichia coli isolated from poultry works, patients and chicken in the eastern province of Saudi Arabia. **Trop.Med.Int.Health**. v.4, n.4, p. 278-283, 1999.
2. DA COSTA, P.M.; BICA, A.; VAZ-PIRES, P.; BERNARDO, F. Effects of antimicrobial treatment on selection of resistant Escherichia coli in broiler fecal flora. **Microb. Drug Resist**. v.14, n.4, p. 299-306, 2008.
3. DAI, L.; LU, L.M.; WU, C.M.; LI, B.B.; HUANG, S.Y.; WANG, S.C. Characterization of antimicrobial resistance among Escherichia coli isolates from chicken in China between 2001 and 2006. **FEMS Microbiol. Lett**. v.286, n.2, p. 178-183, 2008.
4. GYLES, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Anim.Health Res.Rev**. v.9, n.2, p. 149-158, 2008
5. KISER, J.S. A perspective on the use of antibiotics in animal feeds. **J.Anim.Sci**. v.42, n.4, p. 1058-1072, 1976.
6. KNEZEVIC, P.; PETROVIC, O. Antibiotic resistance of commensal Escherichia coli of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. **Int.J.Anitimicrob.Agents**. v.31, n.4, p. 360-363, 2008.
7. MIRANDA, J.M.; VAZEQUEZ, B.I.; FENTE, C.A.; CALO-MATA, P.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.M. Comparison of antimicrobial resistance in Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Listeria monocytogenes strains isolated from organic and conventional poultry meat. **J.Food Prot**. V.71, n.12, p. 2537-2542, 2008.
8. NCCLS; National Committee of Laboratory Standards. Performance Standards of Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – M2-A8.Eight Edition. **NCCLS document (ISBN I-56238-485-6)**. V. 23. nº1 Pennsylvania, USA, 2003.
9. SANNES, M.R.; BELONGIA, E.A.; KIEKE, B.; SMITH, K.; KIEKE, A.; VENDERMAUSE, M. Predictors of antimicrobial-resistant Escherichia coli in the feces of vegetarians and newly hospitalized adults in Minnesota and Wisconsin. **J.Infect.Dis**. v.197, n.3, p. 430-434, 2008.
10. SJOLUND, M.; BONNEDAHL, J.; HERNANDEZ, J.; BENGTSSON, S.; CEDERBRANT, G.; PINHASSI, J. Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. **Emerg.Infect.Dis**. v.14, n.1, p. 70-72, 2008.
11. SOLOMONS, I.A. Antibiotics in animal feeds-human and animal safety issues. **J.Anim.Sci**. v.46, n.5, p.1360-1368, 1978.

12. SOUZA G.F. Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frango de corte. 48f. Porto Alegre, RS. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006
13. THIBODEAU, A.; QUESSY, S.; GUEVREMONT, E.; HOUDE, A.; TOPP, E.; DIARRA, M.S. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. Isolates from commercial broiler chickens receiving growth-promoting doses of bacitracin or virginiamycin. **Can.J.Vet.Res.** v.72, n.2, p. 129-136, 2008.
14. VAN, T.T.; CHIN, J.; CHAPMAN, T.; TRAN, L.T.; COLOE, P.J. safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **Int.J.Food Microbiol.** v.124, n.3, p. 217-233, 2008.
15. WARREN, R.E.; ENSOR, V.M.; O'NEILL, P.; BUTLER, V.; TAYLOR, J.; NYE, K. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. **J.Antimicro.Chemother.** v.61, n.3, p. 504-508, 2008.

5.1.2. Artigo 2

**Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais)
para classificar a resistência a antimicrobianos de
amostras de *Escherichia coli* isoladas de
frangos de corte**

Felipe de Oliveira Salle¹; Flávia Bonarcini Borges Fortes¹ Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha²; Silvio Luis da Silveira Rocha¹, Guilherme Fonseca de Souza¹, Hamilton Luiz de Souza Moraes¹, Vladimir Pinheiro do Nascimento¹, Carlos Tadeu Pippi Salle¹

¹ 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

² Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brasil

RESUMO

A *Escherichia coli* é comumente encontrada na avicultura e, muitas vezes, sua presença no organismo dos animais e/ou contaminando as camas de aviários é achado comum. Por outro lado, a utilização de inteligência artificial, especificamente, redes neurais artificiais, está sendo crescentemente empregada como ferramenta para medir relações não lineares entre variáveis. Neste trabalho foram usados os dados disponíveis referentes a 246 amostras da bactéria oriundas de camas de aviários, lesões de celulite e quadros respiratórios de frangos de corte. O diagnóstico laboratorial envolveu o isolamento do agente, a caracterização dos genes associados à virulência, as lesões provocadas pela inoculação em pintos, o Índice de Patogenicidade das amostras e o comportamento bioquímico que foram as entradas das redes neurais. As saídas foram 14 diferentes antibióticos para os quais as amostras foram resistentes, sensíveis ou apresentaram reações intermediárias. A conclusão foi de que as redes neurais foram capazes de realizar a classificação correta do comportamento das amostras com amplitude de 90,24% a 100%. Ao serem analisadas as sensibilidades das classificações corretas a amplitude foi de 84% a 100%, para as amostras intermediárias, 81% a 100% para as resistentes e 89% a 100% para as sensíveis. Quanto às especificidades, os resultados foram de 100% para as intermediárias, 90% a 100% para as resistentes e 81% a 100% para as sensíveis.

ABSTRACT

The *Escherichia coli* are often found in the poultry industry and, many times, its presence in the organism of the animals and/or contaminating the litter of poultry houses is very common. On the other hand, the use of artificial intelligence, specifically, artificial neural network is being increasingly used as tool to measure not linear relations between variables. In this work we used available data from 246 samples of the bacterium isolated of poultry litter, lesions of cellulitis and respiratory problems of broilers. The laboratory diagnosis involved the isolation of the agent, the characterization of the genes associates with the virulence, the lesions provoked by the inoculation in day-old-chicks, the Pathogenicity Index of the samples and the biochemistry reactions. Those variables were the inputs of the neural network and the outputs were 14 antibiotics. The conclusion was that the neural network were capable to make correct classification of the antimicrobial resistance of all samples with amplitude from 90,24% a 100%. When we analyze the sensitivity of correct classifications the amplitude was 84% - 100% for intermediate, 81% - 100% for resistant and 89% - 100% for sensible. The specificity was 100%, 90%-100% and 81% - 100% for intermediate, resistant and sensible, respectively.

INTRODUÇÃO

As primeiras informações mencionadas sobre a neurocomputação são de 1943, quando foram publicados 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 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, cuja dependência está além de uma simples relação linear ou não. (TATIBANA; KAETSU, 2004)

As redes neurais artificiais 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, ela é capaz de extrair regras básicas a partir de dados reais. (FERREIRA; KÖBIL, 2000).

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 frequentemente chamadas de “caixas pretas”. (FERREIRA; KÖBIL, 2000).

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); Kanayna et al., (2001), crescimento bacteriano (Hajmeer ; Basheer, 2002b; Hajmeer ; Basheer, 2002a; Hajmeer ; Basheer, 2003), seqüência de DNA Kanayna et al., (2001), predições de mutagenicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade Mosier et al., (2003), classificação do comportamento bioquímico Salle et al., (2009), entre outras.

No setor avícola, os primeiros modelos utilizando redes foram publicados por Zhang et al. em 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)

e já utilizaram redes neurais artificiais no setor produtivo. (SALLE et al., 2001; SALLE et al., 2003; REALI, 2004).

A *Escherichia coli* é um microorganismo conhecido por causar doenças em aves, embora ainda não esteja claro se é uma causadora primária ou secundária das enfermidades a ela atribuídas. (MONTGOMERY et al., 2005). Ferreira & Köbl (2000), comentaram que a *E. coli* é considerada secundária a outros agentes, sendo a causa de doenças extra-intestinais em aves. Muitas lesões são apresentadas por aves contaminadas por esta bactéria, tais como: colisepticemia, aerossaculite, peritonite, pleuropneumonia, pneumonia, síndrome da cabeça inchada, osteomielite, entre outros. (BARNES, 1997; FORSTRÖM et al., 1995; MONTGOMERY et al., 2005).

A infecção do trato respiratório, causado pela *E. coli*, é uma das doenças aviárias mais comuns, usualmente ocorrendo entre 2 e 12 semanas de idade. As aves inalam cepas patogênicas de *E. coli*, derivadas das fezes, presentes na poeira do galpão. Normalmente, as defesas do hospedeiro conseguem combater o agente, mas se existirem fatores predisponentes, como a presença de outros patógenos que afetem o trato respiratório, como, por exemplo, o *Mycoplasma gallisepticum*, a *E. coli* conseguirá estabelecer-se, ocasionando problemas respiratórios. A exposição a amônia e a poeira também favorecem a *E. coli*, pois provocam a desciliação do epitélio respiratório. (GROSS, 1994).

Gross em 1994 afirmou que as cepas de *E. coli* que causam colibacilose pertencem à classe de *E. coli* patogênicas. Elas invadem a corrente sanguínea a partir de uma superfície epitelial, sendo similares às cepas que causam infecções extra-intestinais em humanos. Assim, acredita-se que os fatores de virulência presentes em ambas sejam semelhantes, incluindo a presença de pili, resistência ao complemento (resistência ao soro), produção de aerobactina e presença do antígeno K. Muitos estudos demonstram que amostras patogênicas de *E. coli* possuem a capacidade de obtenção de ferro a partir de níveis baixos deste elemento no ambiente em que se encontra no hospedeiro. Este evento ocorre devido à presença da aerobactina, sendo que os genes responsáveis pela expressão desta característica estão relacionados ao plasmídeo Col V.

Em 2003, Delicato *et al.*, realizaram um estudo para verificar a presença de dezesseis genes responsáveis pela virulência de amostras de *E. coli*, através de testes de Reação em Cadeia da Polimerase (RCP), em duzentos isolados deste microorganismo. Ao final da pesquisa, observaram que os genes *iut* A (receptor para aerobactina), *iss* (resistência sérica), *cva* C (colicina V), *tsh* (hemaglutinina sensível à temperatura), *pap*

C e *pap G* (responsáveis pela expressão da fimbria P, um dos fatores de colonização) e *fel A* (fimbria F 11) foram detectados com maior frequência nos isolados obtidos de colibacilose do que nos isolados provenientes de amostras fecais de aves saudáveis, demonstrando que genes de virulência com diferentes potenciais participam na patogenia da colibacilose. Segundo Barnes *et. al.* (1997), os fatores de virulência e os genes responsáveis identificados em amostras de *E. coli* isoladas de aves, comumente encontrados são: capacidade de adesão pela fimbria P (*pap C*) e fimbria F 11 (*fel A*), produção de colicinas (*cva C*), presença de aerobactina (*iut A*), presença dos antígenos capsulares K1 e K5 (*kpsII*), resistência sérica (*iss*) e hemaglutinina sensível à temperatura (*tsh*).

De acordo com Rocha (1999), os fatores de virulência detectados com maior frequência em amostras respiratórias de *E. coli*, isoladas no Rio Grande do Sul, foram a resistência sérica e a produção de colicinas.

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 frequentemente citadas estão: a capacidade de adesão (*pap e fel*) a produção de colicinas (*cva*), a presença de aerobactina (*iut*), a resistência sérica (*iss*) Barnes (1997), hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) e a presença de determinados antígenos capsulares (*kps*). (LA RAGIONE; WOODWARD, 2002).

A classificação dos genes patogênicos e/ou associados à patogenicidade é muito complexa e se constitui numa caixa de Pandora. Infelizmente, o processo não é bem caracterizado, ou seja, não é binário como branco ou negro, mas se constitui em tonalidades de cinza. Isso se aplica à “patogenicidade” do microrganismo, assim como a propriedade “virulenta” dos seus genes. Desta forma, não é possível traçar uma linha precisa entre os genes virulentos e os outros genes (WASSENAAR; GAASTRA, 2001).

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 de avirulentas continua sendo um problema no diagnóstico e, por consequência, na tomada de decisão pelos veterinários de campo. 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 base em 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.

Provas de PCR isoladas (uniplex) foram empregadas para a identificação de sete genes associados à virulência da *E. coli*. (ROCHA, 2006; ROCHA et al., 2008). Posteriormente, Rocha (2008), desenvolveu multiplex PCR trabalhando com as mesmas amostras de 2006.

Segundo Gyles (2008), a resistência mundial aos antimicrobianos pode ser constatada em dezenas de amostras de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* e *Escherichia coli*. O mesmo autor conclui que a evolução das populações bacterianas tem uma relação direta com o aumento da resistência às drogas antimicrobianas, e esse processo de transmissão de resistência com o passar tempo torna-se mais complexo. Essa transmissão de resistência (feita através da troca genética) é definida de acordo com os inúmeros fatores envolvidos, tais como: seleção através do uso de antibióticos nos animais e no homem, produção animal em larga escala, processamento e distribuição dos alimentos, ausência de regulamentos ou tolerância em alguns países.

Quando verifica-se dados de amostras de *E. coli* de aves oriundas do Ártico, região de baixa pressão para a indução de resistência, nas quais foi relatada a resistência a 14 dos 17 antibióticos usados no experimento, fica claro que a indução de resistência parece ser mais complexa do que se imagina. (SJOLUND et al., 2008). Em um trabalho realizado em Portugal 16.000 frangos de corte foram tratados de maneira seqüencial, durante o período de crescimento, com doses inferiores que a terapêutica e com três antibióticos diferentes. Esse procedimento causou um dramático aumento nos níveis de resistência e diversidade no fenótipo das amostras de *Escherichia coli* presentes nos pintinhos (DA COSTA et al., 2008).

A saúde pública tem uma constante preocupação quando o assunto resistência aos antimicrobianos vem à tona. Experimentos realizados demonstraram que amostras de *E.coli* provenientes de granjas avícolas sérvias atingiram uma alta de resistência (63,2%) aos seguintes antimicrobianos: tetracilinas, estreptomicina, ácido nalidíxico e ampicilina. Bactérias conhecidamente comensais são um importante reservatório para a indução de resistência aos antimicrobianos mais antigos. (KNEZEVIC; PETROVIC, 2008). Dados similares, com alta resistência aos antimicrobianos utilizados, foram encontrados em um estudo feito entre os anos 2001 a 2006 na China. As amostras de *E.*

coli revelaram alta resistência a ampicilina (80,2%), doxiciclina (75%) e enrofloxacina (67,5%). Por outro lado, as resistências para cefalotina (32,8%), cefazolina (17%) e amicacina (6,5%) foram consideradas relativamente baixas. Além disso observou-se uma alta resistência ao florfenicol e que esta característica estava associada, principalmente, à presença do gene *florR*. (DAI et al., 2008).

Em Minnesota e Wisconsin, Estados Unidos da América, estudos epidemiológicos evidenciaram que o hábito de comer carne avícola não era fator de predição da ocorrência de *E. coli* resistentes em pacientes hospitalizados naqueles estados, quando comparado com outros de hábitos vegetarianos. (SANNES et al., 2008).

Com o intuito de responder a pergunta se a avicultura orgânica é mais saudável do que industrial, foram pesquisadas 55 amostras de carne avícola orgânica e 61 do produto industrial em relação a resistência bacteriana. Os produtos orgânicos revelaram que as amostras de *E. coli* isoladas possuíam menores níveis de resistência a sete dos dez antimicrobianos usados no experimento. (MIRANDA et al., 2008).

Já no Vietnam, ensaios estudaram a presença de distintos fatores de virulência e de resistência antimicrobiana de 180 amostras de *E. coli* que foram isoladas de matéria-prima de rações, frangos de corte, farinha de ostras e fezes de frangos. Os resultados apresentados apresentaram resistências para: tetraciclina (77,8%), sulfafurazole (60,6%), ampicilina (50,5%), amoxicilina (50,5%), trimetropina (51,5%), cloranfenicol (43,4%), estreptomicina (39,4%), ácido nalidíxico (34,3%) e gentamicina (24,2%). As amostras isoladas de frangos de corte demonstraram uma resistência para as fluorquinolonas assim distribuídas: ciprofloxacina 16,2%, norfloxacina 17,2% e enrofloxacina 21,2%. Os autores foram além e caracterizaram 58 genes associados à virulência, entre eles *papC*, *cvaC*, *fimH*, *iutA*, *iss*, (VAN et al., 2008).

Recentemente, Fortes (2008) estudou o comportamento bioquímico de 261 amostras de *E. coli* isoladas de aves. Os resultados obtidos demonstraram que as amostras positivas para arginina, dulcitol, rafinose e sacarose têm Índices de Patogenicidade (IP) significativamente maiores que as negativas. Por outro lado, as amostras negativas para a salicina e para o teste de indol também possuem IP significativamente mais altos que as positivas. Também concluiu que a salicina, a sacarose, a rafinose, o adonitol e o dulcitol, bem como a arginina e a ornitina apresentaram resultados variáveis para *E. coli*.

O objetivo do presente trabalho é construir redes neurais artificiais para prever os resultados da resistência antimicrobiana de 246 amostras de *Escherichia coli* de

origem avícola. Como entradas, utilizaram-se informações já existentes ou novas, obtidas de trabalhos anteriores gerados no CDPA-UFRGS e que hoje se constituem num robusto banco de dados com informações sobre as amostras isoladas das aves.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados utilizados no presente trabalho estão reunidos num banco de dados gerado no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Utilizaram-se as informações sobre 246 amostras de *Escherichia coli*:

- características bioquímicas (adonitol, arginina, dulcitol, ornitina, rafinose, sacarose, salicina) ;
- índices de patogenicidade (0 a 10);
- lesões provocadas pela inoculação em pintos de um dia (celulite, peritonite, periepatite, pericardite e aerossaculite);
- caracterização dos genes associados à patogenicidade (*papC*, *felá*, *cvaC*, *iutA*, *ISS*, *tsh* e *kpsII*)
- resistência antimicrobiana a 14 antibióticos (amicacina, amoxicilina/ácido clavulâmico, ampicilina, cefalexina, ceftiofur, cefuroxina, ciprofloxacina, clindamicina, cotrimoxazol, enrofloxacina, gentamicina, norfloxacina, ofloxacina e tetraciclina);
- origem das amostras (cama de aviário, celulite e quadros respiratórios);
- motilidade bacteriana

As redes neurais artificiais foram construídas utilizando-se o software Neuroshell Classifier 2.1 (Ward Systems Group, Inc., Frederick, MD, USA, 1997-2000).

Os resultados disponíveis foram transformados de forma binária. Assim sendo os resultados negativos são representados pelo número 0 e os positivos pelo 1. Este critério foi utilizado para a sensibilidade (0) ou resistência (1) aos 14 antibióticos estudados, à ausência (0) ou presença (1) dos genes associados à patogenicidade, à ausência (0) ou presença (1) das distintas lesões observadas nos pintos. As amostras imóveis foram representadas pelo 0 e as móveis pelo 1. No caso da origem das amostras, houve a necessidade de acrescentar mais um valor e a anotação dos dados foi a seguinte: cama (0), celulite (1) e quadros respiratórios (2)

Resumidamente, a rede começa tentando encontrar relações lineares entre as entradas e as saídas. São atribuídos pesos às ligações entre os “neurônios” de entrada e de saída. Feito isto, são adicionados neurônios na camada oculta (no presente trabalho foram usadas 80 camadas) para que relações não lineares sejam encontradas. Os valores de entrada na primeira camada são multiplicados pelos pesos e passados para a segunda camada (oculta). Os neurônios da camada oculta produzem valores que são transmitidos para a camada de saída. Este resultado obtido na camada de saída é comparado com o resultado real e, se necessário, novas camadas ocultas são adicionadas até a obtenção do resultado real, ou o mais próximo dele. Este procedimento se constitui no “aprendizado” da rede neural artificial e a validação se dará com dados que a rede neural desconhece, mas que estará apta a classificar corretamente.

As entradas escolhidas para a construção das redes neurais artificiais foram os índices de patogenicidade, as lesões induzidas em pintos de um dia de idade, a caracterização dos genes associados à patogenicidade, o comportamento bioquímico (utilizou-se somente os bioquímicos que apresentavam variação comportamental nas amostras usadas, foram eles: adonitol, arginina, dulcitol, ornitina, rafinose, salicina, sacarose), a origem das amostras e a motilidade das amostras. As saídas foram a resistência ou sensibilidade a 14 antibióticos obtidas por Salle et al., (2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentadas as características das redes neurais artificiais construídas com as entradas Comportamento Bioquímico (B), Genes associados à patogenicidade (G), Índice de Patogenicidade (IP), Motilidade da *E. coli* (M), Lesões produzidas em pintos de um dia (L) e Origem da amostra (O). As saídas são as resistências ou sensibilidades aos antibióticos estudados por Salle et al., (2009).

Tabela 1. Classificação da resistência bacteriana (intermediária, resistente ou sensível) de 246 amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte frente a 14 antibióticos através do uso de redes neurais artificiais.

| SAÍDAS | ENTRADAS | %COR* | (i) S** | (r) S | (s) S | (i) E | (r) E | (s) E |
|----------------|--------------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Amicacina | G+B+IP+M+L | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Amoxicilina | G+B+IP+M | 100,0 | 1,0 | 1,0 | - | 1,0 | 1,0 | - |
| Ampicilina | G+B+IP+M+L+O | 96,34 | 1,0 | 0,9 | 0,98 | 1,0 | 0,989 | 0,91 |
| Cefalexina | G+B+IP+M+L+O | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Ceftiofur | G+B+IP+M+L | 99,59 | 0,91 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,94 |
| Cefuroxima | G+B+IP+M+L | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Ciprofloxacina | G+B+IP+M+L | 96,34 | 0,84 | 0,92 | 0,99 | 1,0 | 0,98 | 0,92 |

| | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Clindamicina | G+B+IP+M+L+O | 100,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Cotrimoxazol | G+B+IP+M+L | 90,24 | 1,0 | 0,91 | 0,89 | 1,0 | 0,90 | 0,91 |
| Enrofloxacina | G+B+IP+M+L+O | 98,78 | 0,97 | 0,97 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,97 |
| Gentamicina | G+B+IP+M+L+O | 95,93 | - | 0,81 | 0,99 | - | 0,99 | 0,81 |
| Norfloxacina | G+B+IP+M+L | 98,37 | 0,90 | 0,94 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,92 |
| Ofloxacina | G+B+IP+M+L | 99,19 | 0,89 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,96 |
| Tetraciclina | G+B+IP+M+L | 94,72 | 1,0 | 0,94 | 0,96 | 1,0 | 0,96 | 0,94 |

* Percentagem de classificações corretas;

** (i) S= sensibilidade para amostras com resistência intermediária;
 (r) S= sensibilidade para amostras resistentes;
 (s) S= sensibilidade para amostras sensíveis;
 (i) E= especificidade para amostras com resistência intermediária;
 (r) E= especificidade para amostras resistentes;
 (s) E= especificidade para amostras sensíveis.

Na Tabela 1 observa-se com clareza que as redes neurais artificiais foram capazes de classificar a resistência bacteriana frente aos antibióticos estudados. A Amoxicilina teve um percentual de classificações corretas de 100% e usou somente quatro entradas de dados: genes associados à patogenicidade, comportamento bioquímico, índice de patogenicidade e motilidade das amostras. As demais amostras necessitaram de mais informações tais como a origem das amostras e as lesões que provocaram quando inoculadas em pintos de um dia de idade.

Na mesma tabela se observa que as classificações corretas tiveram uma amplitude de 90,24% a 100% o que se configura em uma excelente ferramenta para inferir o comportamento de uma amostra bacteriana frente a determinado antibiótico.

Ao serem analisadas as sensibilidades das classificações a amplitude foi de 84% a 100%, para as amostras intermediárias, 81% a 100% para as resistentes e 89% a 100% para as sensíveis. Quanto às especificidades, os resultados foram de 100% para as intermediárias, 90% a 100% para as resistentes e 81% a 100% para as sensíveis.

Cabe ressaltar que as informações sobre os genes utilizados neste experimento referem-se aqueles relatados na literatura como associados à patogenia das amostras e não à resistência antimicrobiana. Mesmo assim, o conhecimento da sua presença, ou não, associado a outras informações usadas como entradas para a construção da rede neural artificial, foi capaz de prever qual seria a resistência antimicrobiana das amostras. Esta observação faz lembrar as referências de Wassenaar; Gaastra, (2001), na qual eles alertam sobre a complexidade da definição de genes patogênicos e dos associados à patogenicidade levando a pensar que as combinações entre os diferentes genes presentes na bactéria, provavelmente, não são lineares.

As Figuras 1, 2 e 3 retratam a interface do programa computacional de redes neurais artificiais, usado para a colocação das entradas e oferece a predição da resistência da amostra ao antimicrobiano Enrofloxacin com a probabilidade que assim o seja.

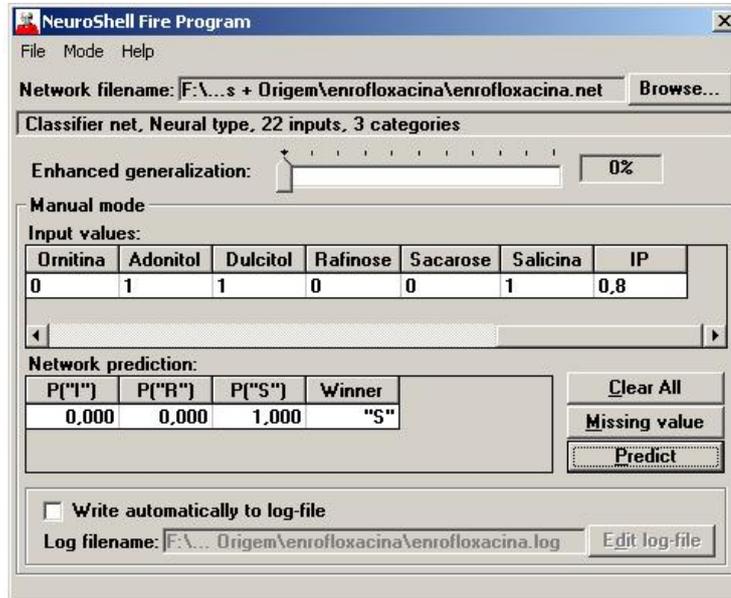


Figura 1: Amostra sensível ao antimicrobiano Enrofloxacin.

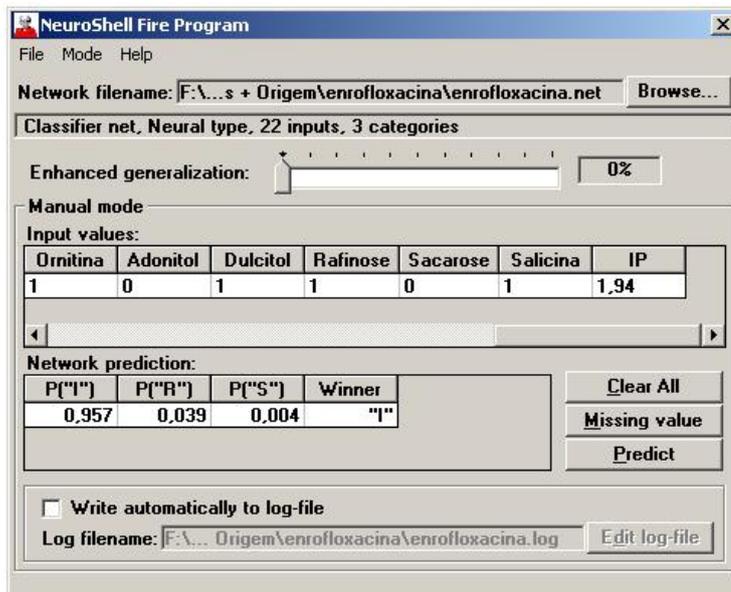


Figura 2: Amostra intermediária ao antimicrobiano Enrofloxacin

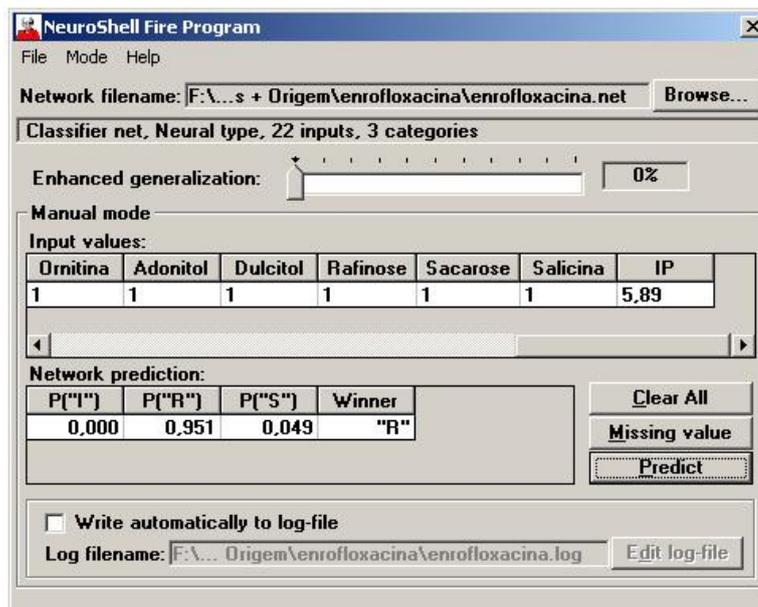


Figura 3: Amostra resistente ao antimicrobiano Enrofloxacina

Figuras 1, 2 e 3. Interface para a colocação dos dados de entrada para a obtenção do resultado Negativo (0) ou Positivo (1) para a saída Enrofloxacina. Devido ao tamanho da figura, não foi possível ilustrar todas as variáveis de entrada utilizadas.

Esta metodologia permite a simulação através da modificação dos dados de entrada, para obter a saída desejada.

Finalmente, ficou demonstrado que as redes neurais artificiais são capazes de aprender a classificar a resistência bacteriana das amostras usadas no experimento a partir das entradas que foram eleitas. Na literatura consultada não foi encontrado trabalho que abordasse o assunto sob o ângulo aqui apresentado.

Resta a validação do método através da aplicação extensiva na qual ela faça as predições com dados de outras amostras que são completamente desconhecidas pelo modelo.

CONCLUSÃO

As redes neurais artificiais foram capazes de classificar a resistência bacteriana de 246 amostras de *Escherichia coli* a partir do conhecimento do índice de patogenicidade, das lesões provocadas pela inoculação em pintos de um dia (celulite, peritonite, periepatite, pericardite e aerossaculite); da caracterização dos genes associados à patogenicidade, do comportamento bioquímico, da origem das amostras (cama de aviário, celulite e quadros respiratórios) e da motilidade bacteriana.

As redes neurais foram capazes de realizar a classificação correta do comportamento das amostras com amplitude de 90,24% a 100%.

Ao serem analisadas as sensibilidades das classificações corretas a amplitude foi de 84% a 100%, para as amostras intermediárias, 81% a 100% para as resistentes e 89% a 100% para as sensíveis. Quanto às especificidades, os resultados foram de 100% para as intermediárias, 90% a 100% para as resistentes e 81% a 100% para as sensíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARNES, H.J.; VAILLANCOURT J.P.; GROSS W.B. Colibacillosis. Calnek B.D.A, **Diseases of Poultry**, University Press, 10ed., p. 631-644, 1997.
2. DA COSTA, P.M.; BICA, A.; VAZ-PIRES, P.; BERNARDO, F. Effects of antimicrobial treatment on selection of resistant *Escherichia coli* in broiler fecal flora. **Microb.Drug Resist.**, v. 14, n. 4, p. 299-306, 2008.
3. DAI, L.; LU, L.M.; WU, C.M.; LI, B.B.; HUANG, S.Y.; WANG, S.C. Characterization of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* isolates from chickens in China between 2001 and 2006. **FEMS Microbiol.Lett.**, v. 286, n. 2, p. 178-183, 2008.
4. DELICATO E.R.; BRITO B.G.; GAZIRI L.C.J.; VIDOTTO M.C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary microbiology**. 94: 97-103. 2003.
5. FERREIRA A. J.P.; KÖBIL T. 2000. Colibacilose Aviária. Berchieri Júnior, A. & Macari, M. Doenças das Aves. Ed. Campinas: FACTA, pp. 197-207. 2000.
6. FORSSSTRÖM J.J.; DALTON K.J. 1995. Artificial neural networks for decision support in clinical medicine. In: *Annals of Medicine*. 27: 509-517. 1995.
7. FORTES F.B.B. 2008. Perfil bioquímico de 261 amostras de *Escherichia coli* isoladas de diferentes materiais de origem avícola no Estado do Rio Grande do Sul. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 53p., Porto Alegre, RS, 2008.
8. GROSS. W.G. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Ed. Gyles, C. L. Guelph: **Cab International**. P.666, 1994.
9. GYLES, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Anim Health Res.Rev.**, v. 9, n. 2, p. 149-158, 2008.
10. 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, 2002a.
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, 2002b.

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. KANAYA S., KINOUCI 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**. 276: 89-99. 2001.
14. KNEZEVIC, P.; PETROVIC, O. Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. **Int.J.Antimicrob.Agents**, v. 31, n. 4, p. 360-363, 2008.
15. LA RAGIONE R.M.; WOODWARD, M.J. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. **Research in Veterinary Science**. 73: 27-35. 2002.
16. MIRANDA, J.M.; VAZQUEZ, B.I.; FENTE, C.A.; CALO-MATA, P.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.M. Comparison of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* strains isolated from organic and conventional poultry meat. **J.Food Prot.**, v. 71, n. 12, p. 2537-2542, 2008.
17. MONTGOMERY R.M.; JONES L.S.; BOYLE C.R. LUO Y.; BOYLE J.A. 2005. The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to various *In Vitro* attributes. **Avian Diseases**. V.49, p.63-69. 2005.
18. MOSIER P.D., JUNG 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, p.721-732. 2003.
19. 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, p.3471-3477. 1992.
20. REALI E.H. Utilização de redes inteligência artificial no gerenciamento da produção de frangos de corte. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 127p., 2004.
21. ROCHA A.C. Fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte com problemas respiratórios. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 1999.

22. ROCHA A.C. Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação de patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte. **Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)** – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 115p., Porto Alegre, RS, 2006.
23. ROCHA A.C.G.P.; ROCHA S.L.S.; LIMA-ROSA C.A.V.; SOUZA G.F.; MORAES H.L.S.; SALLE F.O.; MORAES L.B.; SALLE C.T.P. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.28, p.183-186, 2008.
24. ROCHA S.L.S. Detecção de fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de granjas avícolas do RS através do multiplex-PCR. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 67p., Porto Alegre, RS. 2008.
25. SALLE C.T.P.; CÉ M.C.; SANTOS 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. **Western Poultry Disease Conference**. P.130., 1999.
26. SALLE C.T.P.; GUAHYBA A.S.; WALD V.B. Use of artificial neural networks to estimate production parameters of broiler breeders in breeding phase. **Revista Brasileira Ciência Avícola**. v.3, p.257-264, 2001.
27. SALLE C.T.P.; GUAHYBA A.S.; WALD V.B.; SILVA A.B.; SALLE F.O.; Nascimento V.P. Use of artificial neural networks to estimate production variables of broilers breeders in the production phase. **British Poultry Science**. v.44, p. 211-217. 2003.
28. SALLE, F.O.; FORTES, F.B.B., ROCHA, A.C.G.P.; ROCHA, S.L.S.; DE SOUZA, G.F.; MORAES, H.L.S. Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação do comportamento bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte. **Acta Scientiae Veterinariae** 37[3], 2009.
29. SALLE F.O. Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para classificar a resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* de origem avícola. **(a ser enviado para publicação)**. 2009
30. SANNES, M.R.; BELONGIA, E.A.; KIEKE, B.; SMITH, K.; KIEKE, A.; VANDERMAUSE, M. Predictors of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in the feces of vegetarians and newly hospitalized adults in Minnesota and Wisconsin. **J.Infect.Dis.**, v. 197, n. 3, p. 430-434, 2008.

31. SJOLUND, M.; BONNEDAHL, J.; HERNANDEZ, J.; BENGTSSON, S.; CEDERBRANT, G.; PINHASSI, J. Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. **Emerg.Infect.Dis.**, v. 14, n. 1, p. 70-72, 2008.
32. SOUZA G.F. Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frango de corte. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 48p. Porto Alegre, RS. 2006.
33. TATIBANA C.Y.; KAETSU D.Y. Uma introdução as redes neurais. [Fonte:<<http://www.din.uem.br/ia/neurais>>]. 2004.
34. VAN, T.T.; CHIN, J.; CHAPMAN, T.; TRAN, L.T.;COLOE, P.J. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **Int.J.Food Microbiol.**, v. 124, n. 3, p. 217-223, 2008.
35. WASSENAAR, T.M.; GAASTRA, W. Bacterial virulence: can we draw the line? **FEMS Microbiol.Lett.**, v. 201, n. 1, p. 1-7, 2001.
36. ZHANG Z.; Marquardt R.R.; Wang G.; Guenter W.; Crow G.H.; Han Z.; Bedford M.R. 1996. A simple model for predicting the response of chicks to dietary enzyme supplementation. **J. Anim. Sci.** v.74, p.394-402. 1996.

5.1.3. Artigo 3

Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação do comportamento bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte

Felipe de Oliveira Salle¹; Flávia Bonarcini Borges Fortes¹; Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha²;
Silvio Luis da Silveira Rocha¹, Guilherme Fonseca de Souza¹, Hamilton Luiz de Souza Moraes¹, Lucas
Brunelli de Moraes¹, Carlos Tadeu Pippi Salle¹

¹ 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

² Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da
Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brasil

RESUMO

A *Escherichia coli* é comumente encontrada na avicultura e, muitas vezes, sua presença no organismo dos animais e/ou contaminando as camas de aviários não causa estranheza. Por outro lado, a utilização de inteligência artificial, especificamente, redes neurais artificiais, está sendo crescentemente empregada como ferramenta para medir relações não lineares entre variáveis. Neste trabalho foram usados os dados disponíveis referentes a 261 amostras da bactéria oriundas de camas de aviários, lesões de celulite e quadros respiratórios de frangos de corte. O diagnóstico laboratorial envolveu o isolamento do agente, a caracterização dos genes associados à virulência, as lesões provocadas pela inoculação em pintos, o Índice de Patogenicidade das amostras e a resistência antimicrobiana a 14 antibióticos que foram as entradas das redes neurais e sete provas bioquímicas as saídas. A conclusão foi de que as redes neurais foram capazes de realizar a classificação correta do comportamento das amostras com amplitude de 87,80% a 98,37%. A sensibilidade e a especificidade das classificações obtidas variaram de 59,32% a 99,47% e de 80,00% a 98,54%, respectivamente.

ABSTRACT

The *Escherichia coli* is often found in the poultry industry and, many times, its presence in the organism of the animals and/or contaminating the litter of poultry houses not cause surprise. On the other hand, the use of artificial intelligence,

specifically, artificial neural network, is being increasingly used as tool to measure not linear relations between variables. In this work we used available data from 261 samples of the bacterium isolated of poultry litter, lesions of cellulitis and respiratory problems of broilers. The laboratory diagnosis involved the isolation of the agent, the characterization of the genes associates with the virulence, the lesions provoked by the inoculation in day-old-chicks, the Pathogenicity Index of the samples and the antimicrobial resistance against 14 antibiotics. Those variables were the inputs of the neural network and the outputs were seven biochemical tests. The conclusion was that the neural network were capable to make correct classification of the biochemical reactions of all the samples with amplitude from 87,80% to 98.37%. The sensitivity and the specificity of the classifications varied from 59,32% to 99.47% and from 80,00% to 98.54%, respectively.

INTRODUÇÃO

As primeiras informações mencionadas sobre a neurocomputação são de 1943, foram publicados 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 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 [26].

As redes neurais artificiais consistem em um método de solucionar problemas e, diferentemente dos sistemas convencionais, aprendem, executam operações não lógicas, descobrem as relações ou regras dos dados e exemplos e testam todas as possibilidades em paralelo. A rede neural se baseia nos dados disponíveis para extrair um modelo geral [26]. Para que isto seja possível, o sistema deve ser alimentado com dados reais que permita seu treinamento e aprendizado. Sendo assim, ela é capaz de extrair regras básicas a partir de dados reais [5].

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 frequentemente chamadas de “caixas pretas” [5].

Os trabalhos com *E. coli*, nos quais foram utilizadas redes neurais artificiais, tratam essencialmente de bases de identificação genética de promotores de DNA [14,10], crescimento bacteriano [8,9], seqüência de DNA [10], predições de mutagenicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade [13], entre outras.

No setor avícola, os primeiros modelos utilizando redes foram publicados por Zhang et al. em 1996 [27], 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 [20] e já utilizaram redes neurais artificiais no setor produtivo [21,22,15,23].

A *Escherichia coli* é um microorganismo conhecido por causar doenças em aves, embora ainda não esteja claro se é uma causadora primária ou secundária das enfermidades a ela atribuídas [12]. Ferreira & Köbl (2000) [4] comentaram que a *E. coli* é considerada secundária a outros agentes, sendo a causa de doenças extra-intestinais

em aves. Muitas lesões são apresentadas por aves contaminadas por esta bactéria, tais como: colisepticemia, aerossaculite, peritonite, pleuropneumonia, pneumonia, síndrome da cabeça inchada, osteomielite, entre outros [1,4,12].

A infecção do trato respiratório, causado pela *E. coli*, é uma das doenças aviárias mais comuns, usualmente ocorrendo entre 2 e 12 semanas de idade. As aves inalam cepas patogênicas de *E. coli*, derivadas das fezes, presentes na poeira do galpão. Normalmente, as defesas do hospedeiro conseguem combater o agente, mas se existirem fatores predisponentes, como a presença de outros patógenos que afetem o trato respiratório, como, por exemplo, o *Mycoplasma gallisepticum*, a *E. coli* conseguirá estabelecer-se, ocasionando problemas respiratórios. A exposição à amônia e à poeira também favorecem a *E. coli*, pois provocam a desciliação do epitélio respiratório [7].

Gross em 1994 [7] afirmou que as cepas de *E. coli* que causam colibacilose pertencem à classe de *E. coli* patogênicas. Elas invadem a corrente sanguínea a partir de uma superfície epitelial, sendo similares às cepas que causam infecções extra-intestinais em humanos. Assim, acredita-se que os fatores de virulência presentes em ambas sejam semelhantes, incluindo a presença de pili, resistência ao complemento (resistência ao soro), produção de aerobactina e presença do antígeno K. Muitos estudos demonstram que amostras patogênicas de *E. coli* possuem a capacidade de obtenção de ferro a partir de níveis baixos deste elemento no ambiente em que se encontra no hospedeiro. Este evento ocorre devido à presença da aerobactina, sendo que os genes responsáveis pela expressão desta característica estão relacionados ao plasmídeo Col V.

Em 2003, Delicato *et al.* [3] realizaram um estudo para verificar a presença de dezesseis genes responsáveis pela virulência de amostras de *E. coli*, através de testes de Reação em Cadeia da Polimerase (RCP), em duzentos isolados deste microorganismo. Ao final da pesquisa, observaram que os genes *iut A* (receptor para aerobactina), *iss* (resistência sérica), *cva C* (colicina V), *tsh* (hemaglutinina sensível à temperatura), *pap C* e *pap G* (responsáveis pela expressão da fimbria P, um dos fatores de colonização) e *fel A* (fimbria F 11) foram detectados com maior frequência nos isolados obtidos de colibacilose do que nos isolados provenientes de amostras fecais de aves saudáveis, demonstrando que genes de virulência com diferentes potenciais participam na patogenia da colibacilose. Segundo Barnes *et al.* (1997) [1], os fatores de virulência e os genes responsáveis identificados em amostras de *E. coli* isoladas de aves, comumente encontrados são: capacidade de adesão pela fimbria P (*pap C*) e fimbria F 11 (*fel A*), produção de colicinas (*cva C*), presença de aerobactina (*iut A*), presença dos antígenos

capsulares K1 e K5 (*kpsII*), resistência sérica (*iss*) e hemaglutinina sensível à temperatura (*tsh*).

De acordo com Rocha (1999) [16], os fatores de virulência detectados com maior frequência em amostras respiratórias de *E. coli*, isoladas no Rio Grande do Sul, foram a resistência sérica e a produção de colicinas.

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 frequentemente 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) [1], hemaglutinina temperatura sensível (*tsh*) e a presença de determinados antígenos capsulares (*kps*) [11].

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 de avirulentas continua sendo um problema no diagnóstico e, por consequência, na tomada de decisão pelos veterinários de campo. 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) [25] propõe uma classificação objetiva e com base em 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.

Provas de PCR isoladas (uniplex) foram empregadas para a identificação de sete genes associados à virulência da *E. coli* [17,18]. Posteriormente, Rocha (2008) [19] desenvolveu multiplex PCR trabalhando com as mesmas amostras de 2006.

A resistência antimicrobiana é uma das maiores preocupações para a saúde pública. Salle et al (2009, não publicado) [24] caracterizaram a resistência ou sensibilidade das amostras de *Escherichia coli* utilizadas no presente trabalho frente a 14 antimicrobianos empregando redes neurais artificiais. Estes resultados serão utilizados para os estudos aqui propostos.

Recentemente, Fortes (2008) [6] estudou o comportamento bioquímico de 261 amostras de *E. coli* isoladas de aves. Os resultados obtidos demonstraram que as amostras positivas para arginina, dulcitol, rafinose e sacarose têm maiores Índices de

Patogenicidade (IP) que as negativas. Por outro lado, as amostras negativas para a salicina e para o teste de indol também possuem IP mais altos que as positivas. Também concluiu que a salicina, a sacarose, a rafinose, o adonitol e o dulcitol, bem como a arginina e a ornitina apresentaram resultados variáveis para *E. coli*.

O objetivo do presente trabalho é construir redes neurais artificiais para prever os resultados dos testes bioquímicos variáveis relatados por Fortes (2008) [6]. Como entradas, utilizaram-se informações já existentes ou novas. Neste último caso está a resistência antimicrobiana.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados utilizados no presente trabalho estão reunidos num banco de dados gerado no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Utilizaram-se as informações sobre 261 amostras de *Escherichia coli*:

- características bioquímicas;
- índices de patogenicidade;
- lesões provocadas pela inoculação em pintos de um dia (celulite, peritonite, periepatite, pericardite e aerossaculite);
- caracterização dos genes associados à patogenicidade;
- resistência antimicrobiana a 14 antibióticos;
- origem das amostras (cama de aviário, celulite e quadros respiratórios);
- motilidade bacteriana

As redes neurais artificiais foram construídas utilizando-se o software Neuroshell Classifier 2.1 (Ward Systems Group, Inc., Frederick, MD, USA, 1997-2000).

Os resultados disponíveis foram transformados de forma binária. Assim sendo os resultados negativos são representados pelo número 0 e os positivos pelo 1. Este critério foi utilizado para a sensibilidade (0) ou resistência (1) aos 14 antibióticos estudados, à ausência (0) ou presença (1) dos genes associados à patogenicidade, à ausência (0) ou presença (1) das distintas lesões observadas nos pintos. As amostras imóveis foram representadas pelo 0 e as móveis pelo 1. No caso da origem das amostras, houve a necessidade de acrescentar mais um valor e a anotação dos dados foi a seguinte: cama (0), celulite (1) e quadros respiratórios (2)

Resumidamente, a rede começa tentando encontrar relações lineares entre as entradas e as saídas. São atribuídos pesos às ligações entre os “neurônios” de entrada e de saída. Feito isto, são adicionados neurônios na camada oculta (no presente trabalho forma usadas 80 camadas) para que relações não lineares sejam encontradas. Os valores de entrada na primeira camada são multiplicados pelos pesos e passados para a segunda camada (oculta). Os neurônios da camada oculta produzem valores que são transmitidos para a camada de saída. Este resultado obtido na camada de saída é comparado com o resultado real e, se necessário, novas camadas ocultas são adicionadas até a obtenção do resultado real, ou o mais próximo dele. Este procedimento se constitui no “aprendizado” da rede neural artificial e a validação se dará com dados que a rede neural desconhece, mas que estará apta a classificar corretamente.

As entradas escolhidas para a construção das redes neurais artificiais foram os índices de patogenidade, as lesões induzidas em pintos de um dia de idade, a caracterização dos genes associados à patogenidade, a resistência antimicrobiana, a origem das amostras e a motilidade das amostras. As saídas foram as reações bioquímicas variáveis obtidas por Fortes (2008) [6]: ornitina, arginina, adonitol, rafinose, sacarose, salicina e dulcitol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentadas as características das redes neurais artificiais construídas com as entradas Resistência antimicrobiana (Antib), Genes associados à patogenidade (Gen), Índice de Patogenicidade (IP), Motilidade da *E. coli* (Motilid), Lesões produzidas em pintos de um dia (L) e Origem da amostra (O). As saídas são as distintas reações bioquímicas classificadas como variáveis por Fortes (2008) [6].

Tabela 1. Classificações das reações bioquímicas, positivas ou negativas, de 261 amostras de *Escherichia coli*, através do uso de redes neurais artificiais.

| Saída | Entradas | Class. Corr. (%) | Sens. | Esp. |
|----------|------------------------------------|------------------|--------|--------|
| Adonitol | Antib + Gen + IP + Motilid + L + O | 94,72 | 0,9895 | 0,8000 |
| Arginina | Antib + Gen + IP + Motilid + L | 98,37 | 0,9947 | 0,9464 |
| Dulcitol | Antib + Gen + IP + Motilid + L + O | 94,31 | 0,7963 | 0,9844 |
| Ornitina | Antib + Gen + IP + Motilid + L | 90,24 | 0,5932 | 0,9519 |

| | | | | |
|----------|------------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| Rafinose | Antib + Gen + IP + Motilid + L | 96,34 | 0,8500 | 0,9854 |
| Sacarose | Antib + Gen + IP + Motilid + L + O | 90,65 | 0,8028 | 0,9486 |
| Salicina | Antib + Gen + IP + Motilid + L + O | 87,80 | 0,8800 | 0,876 |

A Tabela 1 também revela que as redes neurais artificiais foram capazes de classificar com grande precisão o resultado positivo ou negativo de todos os testes bioquímicos estudados. O pior resultado, e ainda assim muito bom, foi o obtido para salicina, no qual as classificações corretas foram de 87,80%, acompanhada de sensibilidade de 88% e de especificidade de 87,6%. No outro extremo está a arginina onde 98,37% das classificações estavam corretas e os valores da sensibilidade e da especificidade foram de 99,47% e 94,64%, respectivamente. Os demais testes bioquímicos situam-se entre estes dois extremos, como pode ser observado, e atestam a capacidade das redes neurais classificarem os resultados dos testes bioquímicos a partir de informações disponíveis.

Na Figura 1 é apresentado exemplo de interface para a colocação dos dados de entrada, destinados a classificar a negatividade (0) ou positividade (1) para a arginina. Em razão da totalidade dos dados de entrada ultrapassar o espaço disponível nesta página, somente alguns valores estão aparentes. O resultado apresentado mostra que a amostra do exemplo é arginina positiva com 99,1% de probabilidade.

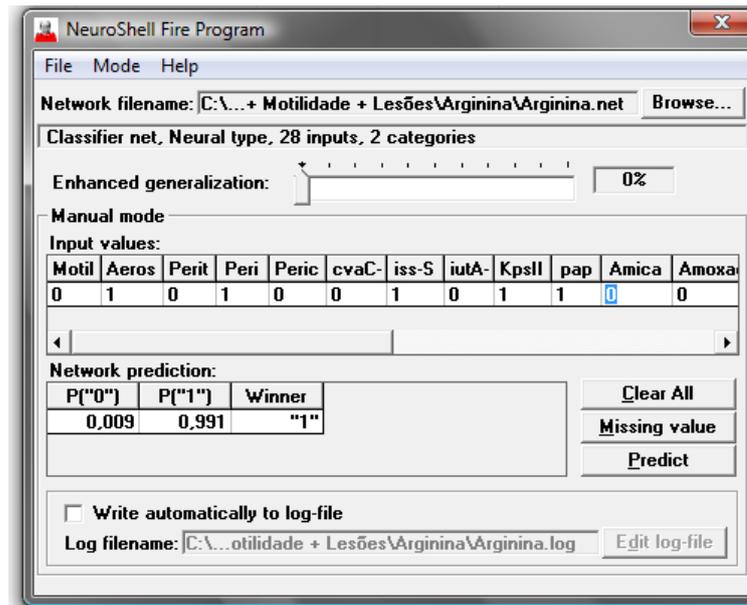


Figura 1. Interface para a colocação dos dados de entrada para a obtenção do resultado Negativo (0) ou Positivo (1) para a saída Arginina.

CONCLUSÃO

As redes neurais artificiais foram capazes de classificar as reações bioquímicas de 261 amostras de *Escherichia coli* a partir do conhecimento do índice de patogenicidade; das lesões provocadas pela inoculação em pintos de um dia (celulite, peritonite, periepatite, pericardite e aerossaculite); caracterização dos genes associados à patogenicidade, resistência antimicrobiana a 14 antibióticos, origem das amostras (cama de aviário, celulite e quadros respiratórios) e da motilidade bacteriana.

LITERATURA CONSULTADA

- 1 Barnes H.J.; Vaillancourt J.P.; Gross W.B. 1997.** Colibacillosis. In: Calnek, B. D. A. (10). Diseases of Poultry. University Press, pp.631-644.
- 2 Cheng B.; Titterington D.M. 1994.** Neural Networks: a review from a statistical perspective. *Statistical Science*. 7: 2-54.
- 3 Delicato E.R.; Brito B.G.; Gaziri L.C.J.; Vidotto M.C. 2003.** Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary microbiology*. 94: 97-103.
- 4 Ferreira A. J.P.; Köbil T. 2000.** Colibacilose Aviária. In: Berchieri Júnior, A. & Macari, M. Doenças das Aves. Ed. Campinas: FACTA, pp. 197-207.
- 5 Forsström J.J.; Dalton K.J. 1995.** Artificial neural networks for decision support in clinical medicine. In: *Annals of Medicine*. 27: 509-517.
- 6 Fortes F.B.B. 2008.** Perfil bioquímico de 261 amostras de *Escherichia coli* isoladas de diferentes materiais de origem avícola no Estado do Rio Grande do Sul. 53f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 7 Gross. W.G. 1994.** Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Ed. Gyles, C. L. Guelph: Cab International. P.666
- 8 Hajmeer M.; Basheer I.A. 2002.** A probabilistic neural network approach for modeling and classification of bacterial growth/no-growth data. *J. Microbiol. Methods*. 51: 217-226.
- 9 Hajmeer M.; Basheer I.A. 2003.** A hybrid Bayesian-neural network approach for probabilistic modeling of bacterial growth/no-growth interface. *J. Food Microbiol*. 82: 233-243.
- 10 Kanaya S., Kinouchi M.; Abe T.; Kudo Y.; Yamada Y.; Nishi T.; Mori H.; Ikemura, T. 2001.** 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*. 276: 89-99.
- 11 La Ragione R.M.; Woodward, M.J. 2002.** Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Research in Veterinary Science*. 73: 27-35.
- 12 Montgomery R.M.; Jones L.S.; Boyle C.R. Luo Y.; Boyle J.A. 2005.** The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to various *In Vitro* attributes. *Avian Diseases*. 49: 63-69.
- 13 Mosier P.D., Jung P.C., Custer L.L., Durham S.K.; Pearl G.M. 2003.** Predicting the genotoxicity of thiophene derivatives from molecular structure. *Chem. Res. Toxicol*. 16: 721-732.

- 14 O'Neill M.C. 1992.** *Escherichia coli* promoters: neural networks develop distinct descriptions in learning to search for promoters of different spacing classes. *Nucleic Acids Res.* 20: 3471-3477.
- 15 Reali E.H. 2004.** Utilização de redes inteligência artificial no gerenciamento da produção de frangos de corte. 127f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 16 Rocha A.C. 1999.** Fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte com problemas respiratórios. Xf. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 17 Rocha A.C. 2006.** Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais) para a Classificação de Patogenicidade de Amostras de *Escherichia coli* Isoladas de Frangos de Corte. 115 f. Porto Alegre, RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 18 Rocha A.C.G.P.; Rocha S.L.S.; Lima-Rosa C.A.V.; Souza G.F.; Moraes H.L.S.; Salle F.O.; Moraes L.B.; Salle C.T.P. 2008.** Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 28: 183-186.
- 19 Rocha S.L.S. 2008.** Detecção de fatores de Virulência de Amostras de *Escherichia coli* Isoladas de Granjas Avícolas do RS Através do Multiplex-PCR. 69f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 20 Salle C.T.P.; Cé M.C.; Santos C.; Guahyba A.S.; Nascimento V.P.; Moraes H.L.S. 1999.** Use of statistical techniques on the interpretation of routine serological data produced by a poultry industry. In: *Western Poultry Disease Conference.* P.130.
- 21 Salle C.T.P.; Guahyba A.S.; Wald V.B. 2001.** Use of artificial neural networks to estimate production parameters of broiler breeders in breeding phase. *Revista Brasileira Ciência Avícola.* 3: 257-264.
- 22 Salle C.T.P.; Guahyba A.S.; Wald V.B.; Silva A.B.; Salle F.O.; Nascimento V.P. 2003.** Use of artificial neural networks to estimate production variables of broilers breeders in the production phase. *British Poultry Science.* 44: 211-217.
- 23 Salle F.O. 2005.** Utilização de Inteligência Artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento do incubatório de uma empresa avícola do sul do Brasil .82f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 24 Salle F.O., Bonarcini, F.B.F., Rocha, A.C.G.P., Rocha, S.L.S., Souza, G.F., Moraes, H.L.S., Nascimento, V.P., Salle, C.T.P. 2009.** Utilização de Inteligência Artificial (redes neurais artificiais) para classificar a resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* de origem avícola. (enviado para publicação).

- 25 Souza G.F. 2006.** Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frango de corte. 48f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 26 Tatibana C.Y.; Kaetsu D.Y. 2004.** Uma Introdução as Redes Neurais. [Fonte: <<http://www.din.uem.br/ia/neurais>>].
- 27 Zhang Z.; Marquardt R.R.; Wang G.; Guenter W.; Crow G.H.; Han Z.; Bedford M.R. 1996.** A simple model for predicting the response of chicks to dietary enzyme supplementation. J. Anim. Sci. 74: 394-402.

5.1.4. Artigo 4

The use of artificial intelligence (artificial neural networks) to classify the pathogenicity of *Escherichia coli* isolates from broilers.

Carlos Tadeu Pippi Salle¹, Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha^{1,2}, Guilherme Fonseca de Souza¹, Felipe de Oliveira Salle¹, Lucas Brunelli de Moraes¹, Flávia Bornancini Borges Fortes¹, Luciana Ruschel do Santos¹, Hamilton Luiz de Souza Moraes¹, Vladimir Pinheiro do Nascimento¹

1. Centre for Avian Pathology Diagnostics and Research (CDPA)
Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul – Brazil.
2. General Coordination of Animal Laboratories, Ministry of Agriculture Livestock and Food Supply, Brazil

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%.

1. Introduction:

E. coli has been fulfilling an important role in poultry industry. The economic losses established until now are still far from the reality found in the fields, in which revenue losses are quite significant. In Brazil, between 2001 and 2005, the condemnation of carcasses due to the presence of lesions in which *E.coli* can be the responsible agent produced damages esteemed in 58 million dollars (Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006).

The virulent mechanisms of samples of potentially avian pathogenic *E.coli* have been continually studied and it is believed that they are multifactorial. Certain properties are primarily associated to these samples and among the ones which are more frequently mentioned we have: adhesion capacity (*pap* and *fel*), colicin production (*cva*), aerobactin presence (*iut*), seric resistance (*iss*) (Barnes, 1994), hemmagglutinin sensitive temperature (*tsh*) and the presence of capsular antigens (*kps*) (La Ragione & Woodward, 2002).

Improvement in research has provided a better comprehension of the mechanisms of pathogenicity and has demonstrated the importance of the interaction between different virulence factors in the pathogenicity determination. However, the differentiation between virulent and non-virulent strains is still a problem when a diagnosis has to be established or decisions have to be made by field veterinarians.

It probably happens due to the complex interactions between the *E.coli* virulence factors and, in addition, the conventional procedures used to establish *E.coli* pathogenicity, in which animals are inoculated, are lengthy, expensive and ethically questioned by the international community.

Moreover, there are no standard procedures to establish and classify the index of pathogenicity, when it is determined *in vivo*, which blocks the comparison between the

obtained results. Attempting to solve these problems, Souza (2006) proposes an objective classification and based on the numerical results he makes feasible the data analysis through a statistical data treatment, which allows results to be compared. This classification shows that the index of pathogenicity has amplitude between 0 and 10.

We believe that, in order to solve the ethic problems arisen from the use of animals and to establish a diagnosis which includes the *E.coli* index of pathogenicity, the use of mathematical models, especially artificial neural networks is the proper tool.

The first information about neural computation appeared in 1943, when McCulloch and Pitts published some articles suggesting the building of a machine based on the human brain. The neural network is a system of 'neurons' connected by synaptic connections, which can be input 'neurons', that receive stimulus from the external environment, or internal or hidden 'neurons' and output 'neurons', that communicate with the outside. The internal neurons are extremely important since it was proved that without them it is impossible to resolve linearly non separable problems.

In other words, we can say that a network is formed by several processing units, which work in a very simple way. These units are in general connected by communication channels which are associated to a certain weight. The units operate only on their local data, which are the input received through their connections. The intelligent behavior of an artificial neural network comes from the interaction between its processing units. These variable phenomena are known as a randomly event, beyond or not a simple linear relation (Tatibana; Kaetsu, 2004).

The neural networks consist in a method for solving problems, and different from the conventional systems, it learns, executes non-logic operations, finds out relations or rules of the data and examples and tests all the parallel possibilities. The neural network is based on the available data in order to extract a general pattern

(Tatibana; Kaetsu, 2004). To make it possible, the system has to be fed with real data, which allows it to be trained and to learn. This way it is ready to extract basic rules from the real data (Forsström; Dalton, 1995). It is necessary to analyze a big amount of data, which is a limitation presented by this tool.

Neural architecture is organized in layers with units that can be connected to the ones from the posterior layer. While the learning process is in progress, the error between the network input and the expected input decreases. In general, the layers are classified as: Input Layer – where the standards are presented to the network; Intermediate or Hidden Layer – where most of the procedures are performed, through the weighed connections which can be considered the extractors of characteristics; Output Layer – where the final result is concluded and presented. However, they never reveal the knowledge behind their decision. On that account, they are called ‘black boxes’ (Forsström; Dalton, 1995).

There are innumerable applications of neural networks. They are used to make prognostics of financial markets; to recognize and generate speaking; to locate points in a radar; to optimize chemical procedures; to recognize targets and detect mines; to identify cancerous cells; to recognize chromosome abnormalities; to detect ventricular fibrillation; to establish paths of spaceships; to recognize handwriting characters, among many others. Investment groups also use these types of neural networks to analyze parts of the financial market.

The studies about *E.coli*, in which neural networks were used, are mainly concerned with genetic identification of DNA promoters DNA (O'Neill, 1992; Demeler, 1991; Demeler, 1991; Kanaya, 2001), biochemical expression (Hajmeer, 2002; Hajmeer, 2002; Hajmeer, 2003), DNA sequences (Kanaya, 2001), prediction of mutagenicity, hepatotoxicity and teratogenicity (Mosier et al., 2003), among others.

Professionals connected to biological sciences are more and more using these processes, although they are not very well known. The first studies in the avian area using neural networks were published by Zhang et al. (1996). Brazilian researchers have already proposed the application of mathematical models to sanitary programs, based on conventional statistics which explained the immunological response in breeding (Salle et al., 1999).

Published papers using neural networks to predict bacterial pathogenicity have not been found. However, several authors have been attempting to establish virulence markers and patterns connected to determinant factors.

Considering that the poultry industry deals with millions of animals and that the costs are proportional to the size of the exportation, and that the antibiotic residue is a continuous preoccupation, the prediction of *E.coli* pathogenicity will objectively direct the clinical procedures of disease control. The present study wants to demonstrate that it is possible to make that prediction by using artificial neural networks without using animals, so that veterinarians can have reports with the pathogenicity degree of isolated samples in order to make more accurate and objective decisions in the field.

It is important to emphasize that we intend to implement a tool to help decision making, not a program to replace technological and scientific knowledge.

2. Materials and Methods:

2.1. Data base:

The analyzed data refer to the presence of genes responsible for the adhesion capacity, P fimbriae (*papC*) and F11 fimbriae (*felA*), colicin production (*cvaC*), aerobactin presence (*iutA*), seric resistance (*iss*), sensitive temperature hemmagglutinin (*tsh*) and the presence of the capsular antigens K1 and K5 (*kpsII*), pathogenicity index or classification (Souza, 2006), motility and origin of samples.

We analyzed 293 samples of *E.coli*. Seventy-six were isolated from litter, 159 from cellulitis lesions and 58 from organs of chicken flocks presenting colisepticemia. The samples isolated from litter were isolated from 73 different poultry properties. The ones presenting colisepticemia were from 55 different chicken flocks presenting respiratory symptomatology and lesions compatible with colibacillosis at the necropsy.

2.2. Artificial neural network:

The artificial neural networks were built by using Neuroshell Classifier software 2.1 (Ward Systems Group, Inc., Frederick, MD, USA).

The construction of the networks was performed in two stages: training and validation.

Three networks are presented in which the input layer includes information about the presence of *papC*, *felA*, *cvaC*, *iutA*, *iss*, *tsh* and *kpsII* genes, motility and sample origin (colisepticemia, cellulitis and litter). The output layer was formed by the 'Pathogenicity Index (PI) (Souza, 2006). In the first network PI varied from 0 to 10. In the second, the PI were classified in 3 categories, non-pathogenic/low pathogenicity (NP/LB) with PI between 0 e 3.99; intermediate pathogenicity (IP) referring to PI between 4 and 6.99 and high pathogenicity (HP) with PI between 7 and 10. Finally, a third network was

built in which a practical situation experienced by field veterinarians was represented, where bacteriae are seen as little pathogenic (non-pathogenic/low (NP/LB)-PI between 0 and 3.99) or pathogenic (Intermediate/high (IP/HP)-PI between 4 and 10). Table 1 summarizes delineation of the 3 networks.

We called ‘input layer’ the set of variables presented to the model calculation and ‘output layer’ the variable to be predicted.

Table 1. Input and output of the artificial neural networks to the classification of the Pathogenicity Index in *Escherichia coli* samples isolated from litter.

| ANN Identification | Input | Output |
|--------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 1 | Genes*, motility, litter origin | PI (0-10) |
| 2 | | NP/L(0-3,99), IP(4-6,99), HP(7-10) |
| 3 | | NP/LP(0-3,99), IP/HP(4-10) |

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

3. Results and Discussion

Molecular diagnostic methods have improved very much, so the diversity of genetic profiles found in the published studies suggest the existence of a real interaction between *E.coli* virulence factors. However, the attempts to establish virulence markers have not achieved a significant progress. In the present study, the verification of the presence of *papC*, *felA*, *cvaC*, *iutA*, *iss*, *tsh* e *kpsII* genes was done due to the different frequency of these genes presented by samples isolated from diseased and clinically healthy birds or from feces (Blanco, 1997; Ngeleka, 2002; Jeffrey, 2002; Brito, 2003; Delicato, 2003; McPeake, 2005).

The results of Network 1, in which the variation of the PI was from 0 to 10, were entirely used, generating 11 categories of data. The correct classification of the PI during the training period was 54.27% (160/293), during the validation was 49.83% (146/293). Further details of this network are presented in Table 2. However, the specificity of 9 in 11 categories of data was superior to 95%. The sensibility presented a great variation,

from 16 to 86% and the index of prediction correctness, for each category was between 16 and 80%.

We believe that these data are due to four factors: the low number of samples per category, the big diversity of genetic profiles (73), the use of samples with the same profile and different PIs and the classification of the samples in adjacent categories. In the category '0', in 73% of errors, the sample was classified as category '1'. In category '1', 89% of the samples were classified as '0'. In '2', 86% were classified between categories '0' and '1'. In category '3', 74% were classified as '0' or '1'. In '8', 14% were classified as '7' and 57% as '9' or '10'. In '9', 55% were classified as belonging to the categories '7' and '10'. In '10', 75% concentrated in category '9'. In the categories '4', '5', '6' and '7' the errors were concentrated in the categories '0' and '1'. In '4', 53%; in '5', 70%; in '6', 50% and in '7', 74%.

Table 2. Contingency table for validation of the artificial neural network 1.

| classification | Prediction | | | | | | | | | | | 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 |
| Sensibility (%) # | 80.3 | 64.0 | 16.0 | 24.1 | 22.7 | 16.6 | 44.0 | 48.0 | 38.4 | 60.8 | 69.2 | |
| Specificity (%) ## | 74.6 | 86.4 | 99.6 | 98.1 | 97.7 | 99.6 | 97.3 | 98.1 | 99.6 | 93.7 | 96.0 | |

N number of samples; * Number of samples correctly classified; # Positive true; ## Negative true

In the present work we always attempted the best precision in the generated models, so we tried to solve the problems with the small number of samples per category and the classification of the samples in adjacent categories by reducing to three the number of categories, originating Network 2: Non-pathogenic / Low Patogenicity (NP/LP) with PI between 0 and 3.99, Intermediate Pathogenicity (IP) with PI varying

between 4 and 6.99 and High Pathogenicity (HP) with PI between 7 and 10. In this case, the correct classification of the samples during the training stage was 80.55% (236/293), during the validation stages was 76.45% (224/293). The details of this network are presented in Table 3. The lowest correctness index (41%) was found in the intermediate category. Analyzing the error distribution, we verified 40% of the samples with high pathogenicity and 60% with low pathogenicity, which confirms this category as Intermediate.

Table 3. Contingency table for validation of the artificial neural network 2.

| Classification | Prediction | | | Total |
|--------------------|------------|----------------|--------|-------|
| | "NonP/Low" | "Intermediate" | "High" | |
| "High" | 16 | 14 | 60* | 90 |
| "Intermediate" | 4 | 24* | 2 | 30 |
| "NonP/Low" | 140* | 21 | 12 | 173 |
| Total (N) | 160 | 59 | 74 | 293 |
| Sensibility (%) # | 87.5% | 40,68% | 81.08% | |
| Specificity (%) ## | 75.19% | 97.44% | 86.3% | |

N number of samples; * Number of samples correctly classified; # Positive true; ## Negative true

As we expected, the reduction of the number of groups improved the performance of the Network. Trying to improve even more its performance, we started to work with two categories only. Consequently, Network 3 was shaped as follows: Non-Pathogenic / Low Pathogenicity (NP/LP) with PI between 0 and 3.99 and Intermediate Pathogenicity / High Pathogenicity (IP/HP) with PI varying between 4 and 10. This reduction in the number of categories also serves a field veterinarian's needs and make decisions easier, since the procedures for *E.coli* samples with high or intermediate pathogenicity are the same. The same occurs to samples presenting non-pathogenicity or low pathogenicity.

With this configuration, the correct classification of samples during the training stage was 83.96% (246/293) and during the validation was 81.2% (237/293). The details for this Network are presented in Table 4. Predictions with similar percentages were obtained by Mosier *et al.* (2003), when making predictions of mutagenicity,

hepatotoxicity and teratogenicity in tiophene derivatives they obtained predictions between 80 and 85% and by O'Neill, (1992), when studying different groups of promoters (DNA sequence), with several functions in *E. coli*, he reported correctness levels between 63 and 82%. All of them say that the generated models are considered very good due to the high level of knowledge and the advances they represent in comparison to previous circumstances.

Table 4. Contingency table for validation of the artificial neural network 3.

| Classification | Prediction | | Total |
|----------------|------------|--------------|-------|
| | "NonP/Low" | "Inter/High" | |
| "NonP/Low" | 131* | 27 | 158 |
| "Inter/High" | 29 | 106* | 135 |
| Total (N) | 160 | 133 | 293 |
| Sensibility# | 81.88% | 79.7% | |
| Specificity## | 79.7% | 81.88% | |

N number of samples; * Number of samples correctly classified; # Positive true; ## Negative true

In order to exemplify the practical uses of these networks, we made some simulations with two new samples of *E. coli*, as it is demonstrated in Tables 5 e 6. We used Network 3, with two pathogenicity classifications. In example 1 the sample was isolated from cellulitis lesions, it was not motile and to PCR it was positive for *iss*, *felA* and *tsh* genes. In the pathogenicity simulation the sample was classified as Intermediate Pathogenicity / High Pathogenicity, with 99.3% of probability. (Figure 1).

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 |
|-------------------|---------|------|-----|------|-------|-------|------|-----|------------|
| 1 | | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

Network prediction:

| P("Apat/Baixa") | P("Inter/Alta") | Winner |
|-----------------|-----------------|--------------|
| 0,007 | 0,993 | "Inter/Alta" |

Figure 1. Pathogenicity simulation. Example 1

In the second simulation we also used Network 3 and the sample was isolated from litter, it was not motile and to PCR it was positive to *iutA*, *kpsII* and *tsh* genes. In the simulation the sample was classified as non-pathogenic / low pathogenicity with 98.1% of probability (Picture 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" |

Figure 2. Pathogenicity simulation. Example 2.

4. Conclusion:

The objectives of the present work were completely achieved. By reaching percentages of correct classifications above 80%, the method we proposed can be used as

a powerful tool to support a field veterinarian's decisions. The characteristics of the model allow the pathogenicity classification for samples isolated in poultry houses with a great degree of certainty, considering the sensitiveness and specificity. It is even more important if we consider a professional's routine, in which all he has in a laboratory examination is the name of the bacteria and occasionally an anti-biogram. So, the technological arsenal represented by molecular biology, in the present situation the PCR proofs, is kept by the laboratories and it is not a useful tool to the field work. In addition, the growing resistance to using animals in experimental procedures completes the matter. Therefore, by offering a new method to support avian veterinarians' decisions, we will affect the cost-benefit relation of medicamental treatments, reduce the antimicrobial resistance induction and drug waste in meat and eggs, among others.

5. References

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. Forsström, J.J.; Dalton, K.J. Artificial neural networks for decision support in clinical medicine. *Annals of Medicine*, n.5, v.27, p.509-517, 1995.
10. 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.
11. Hajmeer, M.N.; Basheer, I. 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.
12. 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.

13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.

22. 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.
23. 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. Abstracts of the 48th Western Poultry Disease Conference. Vancouver - Canada, p.129-129, 1999.
24. 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.
25. Tatibana C.Y.; Kaetsu, D.Y. 2004, disponível em <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.

5.1.5. Artigo 5

Pesq. Vet. Bras. 28(3):183-186, março 2008.

Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry¹

Ana C.G.P. Rocha^{2,3*}, Silvio L.S. Rocha³, Carlos A.V. Lima-Rosa⁴, Guilherme F. Souza³, Hamilton L.S. Moraes³, Felipe O. Salle³, Lucas B. Moraes³ and Carlos T.P. Salle³

ABSTRACT.- Rocha A.C.G.P., Rocha S.L.S., Lima-Rosa C.A.V., Souza G.F., Moraes H.L.S., Salle F.O., Moraes L.B. & Salle C.T.P. 2008. **Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28(3):183-186. Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, 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

The virulence mechanisms of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) have been continually studied and are believed to be multi-factorial. Certain properties are primarily associated with virulent samples and have been identified in avian isolates. In this study a total of 61 *E. coli*, isolates from chicken flocks with respiratory symptomatology, were 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 hemagglutinin (*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 TERMS: *Escherichia coli*, virulence, PCR, poultry, pathogenicity.

RESUMO.- [Genes associados à patogenicidade de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) isoladas de frangos de corte com sintomatologia clínica respiratória.] Os mecanismos de virulência das amostras de *Escherichia coli* potencialmente patogênicas para aves (APEC) têm sido continuamente estudados e acredita-se ser multifatorial. Certas propriedades são associ-

adas primariamente a amostras virulentas e vêm sendo identificadas em amostras de *E. coli* isoladas de aves.

Neste estudo um total de 61 amostras de *E. 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 24,3%, *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 funda-

¹ Received on July 20, 2006.

Accepted for publication on January 15, 2008.

² Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Anexo B, Sala 430, Brasília, DF 70043-900, Brazil. *Corresponding author: ana.crocha@terra.com.br

³ Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil.

⁴ Departamento de Produção Animal e Alimentos, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Av. Luiz de Camões 2090, Bairro Conta Dinheiro, Lages, SC 88520-000, Brazil.

mental to surveillance and competition of poultry processing plants. These rates comprise fundamentally the sanitary aspects of the breeding stock.

Escherichia coli, which is part of the normal microbiota of birds (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 often the secondary agent cause 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 condemnation of part of carcasses or entire carcasses because of the presence of lesions, where *E. coli* could be the responsible agent, caused losses estimated to 58 million dollar, 39 millions of which by systemic lesions (Brasil 2006).

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

The virulence mechanisms of avian pathogenic *E. coli* (APEC) have been continually studied and are believed to be multifactorial. Certain properties are primarily associated with virulent samples and have been identified in avian isolates. The most frequently mentioned are: adhesion capacity (*pap* and *fel*), colicin production (*cva*), aerobactin presence (*iut*), serum resistance (*iss*) (Barnes 1997), hemagglutinin sensitive temperature (*tsh*), and the presence of certain capsular antigens (*kps*) (La Ragione & Woodward 2002).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial samples

Sixty-one *Escherichia coli* isolates from 58 chicken flocks with respiratory symptomatology and post-mortem lesions compatible with colibacillosis were studied. The samples were stored in BHI (Brain Heart Infusion/ Oxoid, England) with glycerol at 30% in a freezer at -20°C. The sample motility was

verified by 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 hemagglutinin (*tsh*) and presence of K1 and K5 capsular antigens (*kpsII*).

PCR

Extraction of the DNA. One milliliter of suspension from a bacterial culture in BHI of 24h at 37°C was collected and centrifuged for 5 minutes. The supernatant was rejected and 800µl of the milliQ water was added. After having been homogenized, the samples were submitted to new centrifugation in the same conditions previously mentioned. The supernatant was rejected and 80µl of milliQ water was added. The samples were then submitted to a temperature of 96°C for 10 minutes in water bath. The supernatant was removed and maintained frozen until the moment of analysis.

Mix. For the genes *iutA* and *cvaC* were used 11.2µl of milliQ water, 2.5µl of PCR buffer 10x (Lab Trade, Brazil), 2µl of dNTP mix with 2.5mM of each nucleotide (Invitrogen Life Technologies, USA), 2µl of 50mM MgCl₂, 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* were used 11.95µl of milliQ water, 2.5µl of PCR buffer 10x (Lab Trade, Brazil), 2µl of dNTP mix with 2.5mM of each nucleotide (Invitrogen Life Technologies, USA), 1.25µl of 50mM MgCl₂ (Lab Trade, Brazil), 1µl of 20pM each primers (Invitrogen Life Technologies, USA), 0.3µl of 5U Taq DNA polymerase (Lab Trade, Brazil) and 5µl of template DNA.

The primers are reported on 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 on Table 1. The tests were done in termal cycler PCT-100 (MJ Research) and the amplified DNA was visualized in agarose gel at 1.2% (Invitrogen Life Technologies, USA) contents ethidium bromide (Sigma, USA).

Reference *Escherichia 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 ala 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> | ggt 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 ctg 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 |

Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry

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>felA</i> (%) | <i>tsh</i> (%) | Motilidade (%) |
|--------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| 14.0 | 45.0 | 28.0 | 11.0 | 15.0 | 24.0 | 34.0 | 33.0 |
| (23.0) | (73.8) | (45.9) | (18.0) | (24.6) | (39.3) | (55.7) | (54.1) |

RESULTS AND DISCUSSION

Many researchers have shown that mechanisms for pathogenicity of APECs are directly related to the interaction of several factors. Several authors dedicated 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 hemagglutinin, 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 the presence of some genes, which are determinant in virulence and motility of litter isolates, was found. The frequency is shown on Table 2.

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 with the potential of membrane formation (Yang & Kinsky 1984).

In this study *cvaC* gene and *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 lipopolysaccharid 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, the protein of which is related to cytotoxic complex inhibition (Bins et al. 1979). The results of the present study are similar to the 72.8% reported by McPeake et al. (2005), the 77% reported by Pfaff-McDonough et al. (2000), and the higher percentage of 81.5% found by Rodriguez-Siek et al. (2005).

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 iron free media at low concentration. *E. coli* especially uses this way of capture and transport

(Rohrbach et al. 1995, Braun 2003). The presence of operon aerobactin is in general related to ColV plasmids, although it can be chromosomal (Linggood et al. 1987, Johnson 1991). Table 2 shows that *iutA* 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, of them Delicato et al. (2003) who got 12%, while Rodriguez-Siek et al. (2005) found 78%. Provence & Curtiss (1994) reported hemagglutination in *E. coli* samples which was detected only at 26-30°C, and therefore was called sensitive temperature hemagglutinin 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 various 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 appendices, 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 genes associated with pathogenicity, which was found in the present study and in other scientific articles, suggests the existence of a real interaction among APEC 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 for the use of antimicrobics in avian production, do not allow professionals to be informed about the *E. coli* pathogenic potential, to direct their procedures. For this to happen, new technology is necessary to detect the pathogenicity of isolates in an objective, fast and efficient way.

Acknowledgements. To Dr. Benito Guimarães de Brito (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desiderio Finamor/IPVDF) for supplying the *Escherichia coli* strains BK 324 e IAPAR 1315, and to 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 through a scholarship.

REFERENCES

- Barnes H.J. 1994. Pathogenesis of respiratory *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* infections in poultry. Respiratory Diseases of Chicken and Turkeys. AAAP, San Francisco, California, USA.
- Barnes H.J. & Gross W.B. 1997. Colibacillosis, p.131-141. In: Calnek, B.W. (ed.), Diseases of Poultry. University Press, Ames, Iowa, USA.
- Bettelheim K.A. 1994. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*, p.3-30. In: Gyles C.L. (ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallington, Oxon, UK.
- Binns M.M., Davies D.L. & Hardy K.G. 1979. Cloned fragments of the plasmid ColV, I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature* 279:778-781.
- Blanco J.E., Blanco M., Mora A. & Blanco J. 1997. 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. Brasil 2006.
- Setor de Estatística, Serviço de Inspeção Federal, Delegacia Federal de Agricultura e Reforma Agrária, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Brasília, DF. Braun V. 2003. Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front Biosci.* 8:1409-1421
- Rocha A.C., Silva A.B., de Brito A.B., Moraes H.L., Pontes A.P., Ce M.C., Nascimento V. & Salle C.T. 2002. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. *Avian Dis.* 46:749-753.
- Brito B.G., Gaziri L.C. & Vidotto M.C. 2003. Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infect. Immun.* 71:4175-4177.
- De Ree J.M., Schwillens P. & Van den Bosch J.F. 1985. Monoclonal antibodies that recognize the P fimbriae F71, F72, F9, and F11 from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 50:900-904.
- Delicato E.R., Brito B.G., Gaziri L.C. & Vidotto M.C. 2003. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet. Microbiol.* 94:97-103.
- Dho M., Lafont J.P. 1982. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. *Avian Dis.* 26:787-797.
- Ewers C., Janssen T., Kiessling S., Philipp H.C. & Wieler L.H. 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.* 104:91-101.
- Gilson L., Mahanty H.K. & Kotler R. 1987. Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J. Bacteriol.* 169:2466-2470.
- Gomis S.M., Riddell C., Potter A.A. & Allan B.J. 2001. 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.
- Gross W.G. 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in Poultry, p.237-260. In: Gyles C.L. (ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallington, Oxon, UK.
- Gyles C.L. 1994. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallington, Oxon, UK.
- Janben T., Schwarz C., Preikschat P., Voss M., Philipp H.C. & Wieler L.H. 2001. 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.
- Johnson J.R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:80-128.
- Johnson J.R., Kuskowski M.A., Gajewski A., Soto S., Horcajada J.P., Jimenez de Anta M.T. & Vila J. 2005. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J. Infect. Dis.* 191:46-50.
- La Ragione R.M. & Woodward M.J. 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.* 73:27-35.
- Linggood M.A., Roberts M., Ford S., Parry S.H. & Williams P.H. 1987. Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J. Gen. Microbiol.* 133:835-842.
- Lior H. 1994. Classification of *Escherichia coli*, p.31-72. In: Gyles C.L. (ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallington, Oxon, UK.
- Luria S.E. & Suit J.L. 1987. Colicins and COL plasmids, p.1615-1624. In: Neidhardt F.C. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: Cellular and molecular biology. Vol.2. American Society of Microbiology, Washington,
- DC. McPeake S.J., Smyth J.A. & Ball H.J. 2005. Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet. Microbiol.* 110:245-253.
- Morris J.A. & Sojka W.J. 1985. The virulence of *Escherichia coli*, p.47-77. In: Sussman M. (ed.), *Escherichia coli* as a Pathogen in Animals. Academic Press, London.

- Naveh M.W., Zusman T., Skutelsky E. & Ron E.Z. 1984. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: effect on pathogenicity. *Avian Dis.* 28:651-661.
- Neilands J.B., Bindereif A. & Montgomerie J.Z. 1985. Genetic basis of iron assimilation in pathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 118:179-195.
- Ngeleka M., Brereton L., Brown G. & Fairbrother J.M. 2002. 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.
- Pfaff-McDonough S.J., Horne S.M., Giddings C.W., Ebert J.O., Doetkott C., Smith M.H. & Nolan L.K. 2000. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis.* 44:23-33.
- Provence D.L. & Curtiss R. 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. III. *Infect. Immun.* 62:1369-1380.
- Rodríguez-Siek K.E., Giddings C.W., Doetkott C., Johnson T.J., Fakhr M.K. & Nolan L.K. 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology.* 151:2097-2110.
- Rohrbach M.R., Braun V. & Koster W. 1995. 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. 2005. Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Vet. Microbiol.* 108:75-87.
- Yang C.C. & Konisky J. 1984. Colicin V treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. *J. Bacteriol.* 158:757-759.

6. DISCUSSÃO

A infecção por *Escherichia coli* é um dos fenômenos mais comuns na avicultura. A presença desta bactéria é tão comum que já é vista como “normal”. Ao aceitar-se a sua presença como algo inevitável o risco aumenta, pois as medidas para medir o dano que a infecção pode causar, praticamente, não são cogitadas de serem empregadas.

Nesta tese são apresentados cinco trabalhos de pesquisa. Dois já foram publicados e os demais serão enviados para publicação nos próximos dias.

Ao consultar a literatura sobre a resistência de *Escherichia coli* para os antimicrobianos nos deparamos com uma imensa quantidade de informações. Por outro lado, a utilidade específica dessas fontes é muito restrita porque está limitada às circunstâncias em que o trabalho foi realizado. Desta forma, a conclusão acacia que se chega é que há resistência bacteriana aos antimicrobianos em todo o mundo. Assim o dizem as literaturas consultadas e citadas nos diferentes trabalhos aqui apresentados. Porém, esta informação tem utilidade limitada para os profissionais que estão na linha de frente da produção avícola. É interessante saber que a *E. coli* presente nas amostras chinesas, sérvias e vietnamitas, têm perfil de resistência similar, ou distinto, das aqui estudadas em relação a alguns antimicrobianos, mas esta informação não é determinante para orientar um tratamento em propriedade brasileira, gaúcha em particular, infectada pela mesma bactéria. Desta forma, as informações contidas no experimento executado da presente tese, que usou 246 amostras isoladas de origem avícola e apresentadas no trabalho aqui incluído são mais específicas no seu conteúdo e no dimensionamento geográfico, porém continua sendo somente um sinalizador para os tratamentos eventuais onde a probabilidade de êxito está relacionada ao percentual de resistência apresentado pelas bactérias. Dito de outra forma, é uma informação genérica que poderá ser usada, muitas vezes, em situações específicas. Ao se considerar que todas as amostras apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos é agregado um fator complicador adicional que levará, invariavelmente, ao aumento da insegurança para a indicação de tratamento eficaz.

A biologia molecular é uma tecnologia moderna e de extrema utilidade para o conhecimento de muitos fenômenos na área biológica. Os pesquisadores que a utilizam em seus experimentos demonstram ao mundo científico que os grupos de pesquisa têm boa formação técnico-científica e que os laboratórios dispõem de equipamentos

modernos. Esta preciosa ferramenta foi utilizada para identificar sete genes associados à patogenicidade de *E. coli* presentes em lesões respiratórias de frangos de corte, sobre os quais estão descritos os protocolos de reação em cadeia da polimerase (PCR) usados e os resultados obtidos são comparados com trabalhos similares encontrados na literatura nacional e internacional, trabalho que foi publicado num prestigiado periódico científico brasileiro. Ao avaliar-se as informações contidas no referido trabalho, o leitor se enriquecerá ao saber que as amostras de casos respiratórios apresentaram *Escherichia coli* com perfis de genes associados à patogenicidade, cujas frequências são similares às obtidas por alguns dos autores consultados e são completamente diversas de outros. Verá que não há unanimidade sobre este tema e terá um vislumbre da sua complexidade. Entretanto saberá a frequência dos genes associados à patogenicidade nas amostras bacterianas empregadas no trabalho publicado que está anexado à tese.

Esta importante informação tende a ser valorizada pelos profissionais que trabalham nos laboratórios e centros de pesquisa, pois encontrarão no documento em questão orientações que lhes poderão ser úteis ao estudarem problemas similares. Infelizmente, os profissionais que estão gerenciando a sanidade avícola nas integrações não terão a mesma sorte para a aplicação prática deste tipo de resultado nas suas labutas diárias e se desestimularão para leituras de trabalhos similares futuros. Assim sendo, o abismo existente entre a universidade e a empresa só cresce e, conseqüentemente, aumenta o represamento das informações dentro dos muros da universidade.

No nosso entender, no século XXI a maior dificuldade dos profissionais é a filtragem das informações encontradas em profusão na literatura. Essa mesma fonte que está ao alcance de todos através de oportunidade democrática e rica, chamada internet. Os alunos de graduação e de pós-graduação, hoje em dia, dispõem de mecanismos e programas computacionais disponíveis na rede mundial que buscam em minutos imensa quantidade de artigos e filtram os temas encontrados em, praticamente, todos os assuntos. Ao retroceder-se somente uma geração, observa-se uma situação exatamente oposta, quando os alunos aprendiam a consultar indexadores e, posteriormente, encontrar artigos de seu interesse nas bibliotecas que lentamente, engrossavam seus arquivos bibliográficos. Verificou-se, na prática, que a informática e a internet revolucionaram o ensino e o aprendizado em todo o mundo. Com isso, criam-se, em um curto espaço de tempo, situações novas que exigem novas soluções.

Há mais de dez anos o grupo de pesquisa do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) tem buscado a utilização de metodologias que visem a

geração de critérios que ofereçam suporte à decisão daqueles que trabalham com a cadeia de produção avícola. Como pode ser visto nos conteúdos dos trabalhos que compõem esta tese, em 1999 havia publicação original do grupo que já demonstrava que a resposta imunológica poderia ser explicada através de equações matemáticas e que estas serviriam de padrões para a interpretação dos exames sorológicos que a avicultura realiza de forma rotineira e cara. Posteriormente, as publicações enveredaram por caminhos tecnológicos mais complexos e foi demonstrado que todos os segmentos da produção avícola poderiam ser explicados através do emprego de inteligência artificial, especificamente, redes neurais artificiais.

Em 2006, Souza apresentou dissertação na qual foi proposta uma nova metodologia para o cálculo da patogenicidade de isolados de *Escherichia coli* de origem avícola. Ele usou as mesmas amostras bacterianas empregadas nos trabalhos aqui incluídos. Ao usar os métodos encontrados na literatura consultada foi constatado que nenhum deles era satisfatório. Em decorrência desta dificuldade foi criado um novo método de cálculo de índice de patogenicidade que propunha o Fator de Bonificação de Sobrevivência como constante para atribuir valor ao tempo de morte dos animais pós-inoculação e as lesões induzidas pela amostra bacteriana nos sete dias de observação. É um método original que, no nosso entender, oferece um modelo que retrata melhor o fenômeno biológico observado. Porém, havia a necessidade inconveniente de inocular e observar por sete dias, em condições apropriadas, 10 pintos de um dia para cada nova amostra de *E. coli* isolada na rotina laboratorial. Se esse empecilho não fosse resolvido, o médico veterinário no campo continuaria sem as informações sobre a patogenicidade das amostras isoladas nas granjas sob sua responsabilidade, pois a inoculação rotineira de animais no laboratório não é prática e, acima de tudo, esbarra em conceitos éticos.

Apesar dos avanços conquistados ainda não era possível relacionar os genes associados à virulência e o índice de patogenicidade das bactérias de novas amostras sem que fossem usados animais como indicadores. Havia uma variedade de combinações genéticas que se refletiam em muitos índices patogênicos e parecia que esta relação não era linear. Houve então a necessidade de buscar uma ferramenta que pudesse medir relações não lineares de maneira rápida, objetiva, cientificamente embasada e com ela prever o índice de patogenicidade das *Escherichia coli* que seriam isoladas sem a inoculação de aves. Este foi o objetivo norteador do trabalho aqui anexado e que demonstrou que o uso de redes neurais artificiais era capaz de classificar o índice de patogenicidade desde que lhe fossem oferecidas informações sobre os genes

presentes, a origem das amostras e a motilidade bacteriana. Os resultados deixam claro que as predições são precisas e as classificações dos índices de patogenicidade são acompanhados da probabilidade de estarem corretos. O trabalho mostra que os profissionais da área no campo poderão saber o índice de patogenicidade das amostras isoladas de seus animais ou granjas sem a necessidade de inocular animais.

Mais tarde, as amostras bacterianas do experimento tiveram suas características bioquímicas estudadas por Fortes (2008), que selecionou sete testes dos quais as amostras de *E. coli* apresentavam comportamento variável e relacionou os resultados dos testes com os índices médios de patogenicidade das bactérias.

As mesmas amostras foram confrontadas com 14 antimicrobianos e os resultados estão descritos em trabalho anexado a esta tese que foi recentemente aceito para publicação, já mencionado anteriormente.

Restava, então, saber se a utilização de inteligência artificial era capaz de predizer, ou classificar, as reações bioquímicas variáveis das amostras e a resistência aos antimicrobianos a partir das informações colhidas ao longo do tempo e contidas no banco de dados. A primeira questão foi respondida positivamente no trabalho intitulado *Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais) para a Classificação do Comportamento Bioquímico de Amostras de Escherichia coli Isoladas de Frangos de Corte*. Os resultados obtidos foram promissores, embora tenham aplicação prática restrita à atividade laboratorial.

Depois de saber se a bactéria que infecta seus animais é patogênica ou não, surge uma nova pergunta que será formulada pelo médico veterinário na granja: qual a alternativa de tratamento mais eficaz? Esta questão pode ser respondida através do trabalho intitulado *Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais) para Classificar a Resistência Antimicrobiana de Amostras de Escherichia coli Isoladas de Frangos de Corte*. Os resultados gerados neste experimento demonstraram o alto grau de precisão que as redes neurais artificiais alcançaram para classificar a resistência bacteriana contra os antimicrobianos em estudo. A metodologia apresentada é muito importante face as duras restrições ao uso de antibióticos em animais e os possíveis reflexos na saúde pública. As aves industriais, criadas em confinamento e em grandes densidades populacionais, sempre correrão o risco de adoecerem e necessitarem tratamento adequado. Desta forma, fornecer ao profissional em atividade no campo qual a melhor, ou as melhores, alternativas de tratamento com antimicrobianos trarão como benefícios a redução do custo com medicação, do tempo de tratamento e dos resíduos

nos produtos avícolas. Os reflexos positivos serão sentidos nos mercados interno e externo e em menores riscos para a saúde pública. Com esse trabalho verificou-se que a utilização de redes neurais foi capaz de classificar a resistência a antimicrobianos, o comportamento bioquímico e o índice de patogenicidade das amostras de *Escherichia coli* usadas nos experimentos.

Finalmente, este trabalho juntamente com os citados, quando se analisa as atividades de pesquisa desenvolvidas no CDPA como um todo, percebe-se que está sendo proposto um novo sistema de análise de risco que deve ser analisado e validado pela avicultura brasileira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF, Disponível em URL< <http://www.abef.com.br>>. Acesso em 4 de novembro de 2006.

ASGAV- Associação Gaúcha de Avicultura. Comunicação Pessoal. José Eduardo dos Santos. Secretário Executivo 2005. Disponível em URL< <http://www.asgav.com.br>> Acesso em 25 de junho de 2006.

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.

BLANCO, E.J.; BLANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J.; Prevalence of Bacterial Resistance to Quinolones and other Antimicrobials among Avian *Escherichia coli* Strains Isolated from Septicemic and Healthy Chickens in Spain. **Journal of Clinical Microbiology.** V. 35, pg. 2184-2185, nº 8. Aug. 1997.

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

COURVALIN, P. Antimicrobial Drug Resistance “Prediction Is Very Difficult, Especially About The Future” **Emerging Infections Diseases.** V. 11, nº10, p. 1503-1506, October, 2005.

DA ROCHA, A.C.G.P. **Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação de patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte.** 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência veterinárias) UFRGS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul , Faculdade de Veterinária, Porto Alegre-RS. 2006.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research,** v.30, n.2-3. p. 299-316, 1999.

DOSS, S.A. Chromosomally-mediated antibiotic resistance and virulence. **Journal Medical Microbiology.** v. 40, pg. 305-306. 1994.

DRLICA, K.; ZHAO, X.L. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiol. Rev.** v. 61. pg. 377-392. 1997.

EVERETT, M.J.; PIDDOCK, L.J.V. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones. p. 258-297. 1998. In: KULMANN, J.; DAHLHOFF, A. & ZEILER, H. J. Quinolones antibacterial. **Springer-Verlag KG** , Berlim, Germany. 1998.

FLOCK, D. Poultry breeding – the next 25 years. **World Poultry**. Reed Business.v.25, n.1, p. 22-23. 2009.

FLUIT, A.D.C.; VISSER, M.R.; SCHMITZ, F.J. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 14, n. 4. p. 836-871. Oct. 2001.

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

FORTES F.B.B. 2008. Perfil bioquímico de 261 amostras de *Escherichia coli* isoladas de diferentes materiais de origem avícola no Estado do Rio Grande do Sul. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 53p., Porto Alegre, RS, 2008

GERMON P.; CHEN, Y.H.; HE, L.; BLANCO, J.E.; BREE, A.; SCHOULER, C.; HUANG, S.H.; SCHOULEUR, M.M. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.151, p.1179-1186, 2005.

GROSS, W. B. Diseases due *Escherichia coli* in poultry. In: GYLES C. L. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. **CAB**. Wallingford, UK. p. 237-260.ed. 1994.

HOOPER, D. C. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones. **Drug Resistance Updates**. v. 2. p. 38-55.1999.

IKUNO, A.A. et al. Genes de virulência associados em *Escherichia coli* (APEC) isoladas de poedeiras comerciais, do meio ambiente e da água de dessentação de granjas de postura de ovos. **O Biológico**, São paulo, v.68, 2006. Suplemento 2. Trabalho apresentado na Reunião Anual do Instituto Biológico, 2006, São Paulo. Resumo 132/026. Disponível em

http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/132.PDF Acesso em 01 de fevereiro de 2008.

KANG, H.Y.; JEONG,Y.S.; OH, J.Y.; TAE,S.H.; CHOI,C.H.; MOON, D. C.; LEE,W.K.; LEE,Y.C.; SEOLI,S.Y.; CHO,D.T.; LEE,J.C. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. **J.Antimicrob.Chemother**. v. 55. pg 639-644. 2005.

KOVÁCS, Z.L. **Redes Neurais Artificiais**: Fundamentos e Aplicações: um texto básico. 2.ed. São Paulo: Edição acadêmica, p.1-174, 1996.

LEE, A.; ULBRICHT, C.; DORFFNER, G. Application of artificial neural networks for detection of abnormal fetal heart rate pattern: a comparison with conventional algorithms. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v.19, n.5, p.482-485, 1999.

MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C.M.; CURTISS, R.; BROWN, P.K.; ARNE, P.; BREÉ, A.; DESAUTELS, C.; FAIRBORTHER, J.M. Role of virulence

factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v.71, n.1, p. 536-540, 2003.

McMANUS, M. **Mechanims of bacterial resistance to antimicroial agents**. Am. Journal Health System Pharm. v. 54. pg. 1420-1433. 1997

NCCLS; National Commitee of Laboratory Standards. **Performance Standards of Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard – M2-A8.Eight Edition. NCCLS document (ISBN I-56238-485-6). V. 23. n°1 Pennsylvania, USA, 2003.

PERIC, L. The search for high performance and high fertility. **World Poultry**. Reed Business. v. 25, n.1, p. 24-26. 2009.

QUINTILIANI, R.; COURVALIN, P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. Pg. 1308-1326. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER F. R. & YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**, 6th ed. ASM Press, Washington, D. C. 1995.

ROSENBLATT, F. The perceptron: a probabilistic model for information storage and organization in the brain. **Psychological Review**. v.65, n.6, p.386-408, 1958

ROUSH, W.B.; KIRBY, Y.K.; CRAVENER, T.L.; WIDEMAN, R.F., Jr. Artificial neural network prediction of ascites in broilers. **Poult. Sci**. v.75, n.12, p.1479-1487, 1996.

SOUZA, G.F. Dissertação Mestrado em Ciências Veterinárias. **Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de provenientes de cama de aviários, lesões de pelo e de quadros respiratórios, através da inoculação em pintos de 1 dia**. UFRGS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, 2006.

STEHLING, E.G.; YANO, T.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W.D. Characterization of a plamid-encoded adhesion of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrome (SHS). **Veterinary microbioly**. v.95, p. 111-120, 2003.

UBA, 2009. Relatório Anual 2007 – 2008. Disponível em URL <<http://www.uba.org.br>>. Acesso em 05 de abril de 2009.

VANDEMAELE, F.; VANDEKERCHOVE, D.; VEREECKEN, M.; DERIJCKE, J.; DHO-MOULIN, M.; GODDEERIS, B.M. Sequence analysis demonstrates the conservation of fimH and variability of fimA throughout avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Vet.Res**. v.34, p. 153-163, 2003.

ZHAO S.H.; MAURER, J.J.; HUBERT, S.; De VILLENA, J.F.; McDERMOTT, P.F.; MENG, J.H.; AYERS, S.; ENGLISH, L.; WHITE, D.G. Antimicrobial Susceptibility and Molecular Characterization of Avian Pathogenic *Escherichia Coli* Isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 215-224. 2005.

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

YANG, H., CHEN, S., WHITE, D. G., ZHAO, S., MCDERMOTT, P., WALKER, R.,; MENG, J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. **J.Clin.Microbiol.**, 42(8): 3483-3489. 2004.