

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

ESTABELECIMENTO DE UM NOVO ÍNDICE DE PATOGENICIDADE PARA
AMOSTRAS DE *E. COLI* E O USO DE REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

Tese de Doutorado

Guilherme Fonseca de Souza

Porto Alegre

2010

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

ESTABELECIMENTO DE UM NOVO ÍNDICE DE PATOGENICIDADE PARA
AMOSTRAS DE *E. COLI* E O USO DE REDES NEURAS ARTIFICIAIS

AUTOR: Guilherme Fonseca de Souza
Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na Área de
Sanidade Avícola do programa de Pós-
graduação em Ciências Veterinárias da
UFRGS. Orientador: Prof. Dr. Carlos
Tadeu Pippi Salle .

Porto Alegre

2010

GUILHERME FONSECA DE SOUZA

ESTABELECIMENTO DE UM NOVO ÍNDICE DE PATOGENICIDADE PARA
AMOSTRAS DE *E. COLI* E O USO DE REDES NEURAIAS ARTIFICIAIS

Estabelecimento de uma novo índice de patogenicidade utilizando amostras de E.coli e
Redes Neurais Artificiais na distribuição de lesões a partir de um teste in vivo destas
mesmas

Aprovada em de de 2010

Aprovado por:

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Adriano da Silva Guahyba

Prof. Dr. Luís César Bello Fallavena

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes

AGRADECIMENTOS

A minha família, que sempre me apoiou nessa jornada e tornou possível a realização de um sonho . Dedico esse Título a vocês .

Ao Dr.Carlos Tadeu Pippi Salle, pela orientação e amizade.

Ao Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes, excelente pessoa e profissional sempre presente.

Aos colegas de laboratório: Ana Cristina da Rocha, Felipe Salle e Anderlise Borsoi, pela boa convivência e ajuda em meu experimento.

Aos ex-estagiários e agora colegas: Fabrício Imperatori, Rafael Peruzzolo, José Roberto Bastos, Vanessa de Ávila, Thiago Kirst, Gabriel Lima, que, das mais variadas formas, contribuíram para a realização de meu trabalho.

Aos meus amigos: Antônio Elian, Rodrigo Arellano, Alexandre Mendes, Ricardo Casilhas, José Emmanuel Burle, José Roberto Gonçalves, Leandro Lousada, pois, se é na juventude que se molda o caráter, durante essa fase , não podia ter tido a companhia de pessoas melhores .

Ao Dr. Benito Brito pelo agradável ano no IPVDF, lugar que eu fiz muitos amigos queridos.

Ao Estado do Rio Grande do Sul, que vem, ao longo desses 5 anos, fortalecendo minha convicção de que todos nós, brasileiros, devemos lutar por valores em que acreditamos.

A Débora Maciel Leal, grande amiga e companheira , que espero ter para sempre ao meu lado.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1 A <i>Escherichia coli</i> | 15 |
| 2.2 A colibacilose aviária | 16 |
| 2.3 A celulite aviária | 17 |
| 2.3.1 Caracterização das lesões de celulite | 17 |
| 2.3.2 A etiologia da celulite aviária | 18 |
| 2.3.3 Lesões de celulite concorrente com outras causas de condenação por colibacilose | 19 |
| 2.3.4 A celulite aviária e os riscos a saúde pública | 20 |
| 2.4 Fatores de virulência | 21 |
| 2.5 Testes de patogenicidade | 26 |
| 2.6 Redes Neurais Artificiais | 32 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 3.1 Amostra bacteriana | 37 |
| 3.2 Teste <i>in vivo</i> | 37 |
| 3.3 Estabelecimento de critérios para a determinação do índice de patogenicidade | 37 |
| 3.4 Investigação dos genes relacionados a virulência | 39 |
| 3.5 Redes Neurais Artificiais | 39 |
| 3.6 Análise estatística | 40 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 4.1 Resultados obtidos através do Índice de patogenicidade | 41 |
| 4.2 Perfil de distribuição de lesões obtidas no teste <i>in vivo</i> | 47 |
| 4.3 Uso de Redes Neurais artificiais na compreensão dos testes <i>in vivo</i> | 50 |
| 5 CONCLUSÕES | 61 |

6 ANEXOS

6.1 – Comprovante do aceite do artigo

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

6. 3– Developing an animal model for classification of Pathogenicity on *E.coli* avian origin

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

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Distribuição das amostras de <i>Escherichia coli</i> conforme o grupo do Índice de Patogenicidade e desconsiderando a origem das amostras | 42 |
| FIGURA 2 – Retirada do tecido subcutâneo com exposição da musculatura peitoral | 43 |
| FIGURA 3 – Abertura da cavidade celomática em uma ave sadia | 43 |
| FIGURA 4 – Retirada do tecido subcutâneo com exposição da musculatura peitoral com lesão de celulite | 43 |
| FIGURA 5 – Abertura da cavidade celomática com lesão de perihepatite e pericardite | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Exemplo do estabelecimento do índice de patogenicidade de uma amostra de <i>E. coli</i> utilizada no experimento | 41 |
| Tabela 2 – Distribuição das amostras de <i>Escherichia coli</i> conforme o grupo do Índice de Patogenicidade considerando a origem das amostras e a estação do ano | 46 |
| Tabela 3 - Média dos Índices de Patogenicidade de <i>Escherichia coli</i> , conforme a origem das amostras | 47 |
| Tabela 4 - Índice de Patogenicidade de <i>E. coli</i> isoladas de lesões cutâneas e de camas em duas estações do ano | 48 |
| Tabela 5 - Índice de Patogenicidade de acordo com a estação do ano e da origem do isolamento da <i>Escherichia coli</i> | 48 |
| Tabela 6 - Agrupamento de patogenicidade (Brito,2001) versus Índice de Patogenicidade, desconsiderando a origem das amostras | 49 |
| Tabela 7 - Índices de patogenicidade de amostras de <i>E.coli</i> presentes em três diferentes granjas de uma integração avícola | 49 |
| Tabela 8 – Dia de morte dos animais de acordo com a estação do ano com a origem do isolamento da <i>Escherichia</i> | 50 |
| Tabela 9 - Comparação entre as lesões apresentadas no traçado do Índice de Patogenicidade, desconsiderando a fonte da amostra | 50 |
| Tabela 10 - Presença de aerossaculite induzida pelas amostras de <i>E. coli</i> de acordo com a origem do isolamento | 51 |
| Tabela 11 - Presença de peritonite induzida pelas amostras de <i>E. coli</i> de acordo com a origem do isolamento | 52 |
| Tabela 12 - Presença de perihepatite induzida pelas amostras de <i>E. coli</i> de acordo com a origem do isolamento | 52 |
| Tabela 13 - Presença de pericardite induzida pelas amostras de <i>E. coli</i> de acordo com a origem do isolamento | 52 |
| Tabela 14 - Presença de celulite induzida pelas amostras de <i>E. coli</i> de acordo com a origem do isolamento | 53 |

| | |
|---|----|
| Tabela 15- Validação da Rede Neural Artificial FV + ORI= Aerossaculite (5) | 54 |
| Tabela 16 - Validação da rede neural artificial Rede neural FV+ORI= Perihepatite (3) | 55 |
| Tabela 17 - Validação da Rede Neural Artificial FV +ORI+ IP= (3)= Perihepatite (3) | 56 |
| Tabela 18 - Validação da Rede Neural Artificial FV+ORI+Cel(N)= Lesões (3) | 57 |
| Tabela.19 - Validação da Rede Neural Artificial FV e origem dos isolados | 58 |
| Tabela 20 - Validação da Rede Neural Artificial FV e patogenicidade dos isolados | 59 |
| Tabela 21 - Amostras selecionadas com todos os Fv e Motilidade | 60 |

RESUMO

A colibacilose é a denominação comum a diferentes lesões locais ou sistêmicas causadas pela bactéria *E.coli* com propriedades patogênicas . Essas lesões são conhecidas como a principal causa infecciosa de condenação de carcaças. No Brasil, entre 2001 e 2005, essa condenação gerou um prejuízo estimado em US 58 milhões à avicultura . Deste total, 19 milhões podem ser creditados à presença de lesões cutâneas de celulite e 39 milhões a lesões sistêmicas. A *E.coli* é o principal habitante do trato gastrointestinal de mamíferos e de aves. Nos aviários, é possível encontrar 10^6 UFC/grama de fezes, tornando praticamente impossível a eliminação deste agente no ambiente. A dificuldade que envolve a *E.coli* está na classificação desta como patogênica, haja vista que a diferenciação entre cepas virulentas e avirulentas continua sendo um problema após o diagnóstico bacteriológico. A biologia molecular vem auxiliando no maior entendimento dos mecanismos de patogenicidade das *E. coli* e cada vez mais, é demonstrada a grande importância da interação dos diversos fatores de virulência na determinação da patogenicidade. Este trabalho tem como objetivo gerar novos elementos para o maior entendimento da patogenicidade da *E.coli*, traçando uma nova metodologia de classificação, através de um índice no qual, além do número de animais mortos, também se consideraram o tempo de morte e a capacidade da cepa causar lesão compatível à colibacilose em pintos de 1 dia. Observou-se diferença significativa entre amostras oriundas de celulite e quadro respiratório em relação a amostras oriundas de cama no método proposto, além do fato de também existir a mesma relação entre o tipo e a quantidade de lesões formadas, conforme a origem do isolado. Obteve-se, ainda, um banco de dados gerado a partir desse primeiro experimento, que permitiu o uso de Redes Neurais Artificiais na construção de modelos que simulavam esse mesmo teste de patogenicidade, sem o uso de animais, adotando como informações de entrada alguns dos principais fatores de virulência associados a amostras patogênicas, origem das amostras e o índice de patogenicidade obtidos. Os resultados quanto às predições corretas foram em torno de 80,00%, permitindo concluir que as redes podem ser uma alternativa para substituir testes de patogenicidade *in vivo* na classificação de amostras de *E.coli* de origem aviária.

ABSTRACT

The colibacillosis is the common denomination for different local or systemic lesions caused by *E. coli* bacteria with pathogenic properties. These lesions are known as the leading infectious cause of condemnation of carcasses. In Brazil, between 2001 and 2005, that disease led to a loss estimated at 58 million for poultry. Of this total, 19 million can be credited to the presence of cutaneous lesions of cellulitis and 39 million to other organs. *E. coli* is the main habitant of the gastrointestinal tract of mammals and birds. In the aviaries, you can find 10^6 CFU / gram of feces, making it virtually impossible to eliminate this agent in the environment. The difficulty surrounding the *E. coli* in this classification as pathogenic, given that the differentiation between virulent and avirulent strains remains a problem after the bacteriological diagnosis. Molecular biology has helped in better understanding the mechanisms of pathogenicity of *E. coli* and, increasingly, it demonstrated the great importance of the interaction of different virulence factors in determining the pathogenicity. This work aims to generate new elements for better understanding the pathogenicity of *E. coli*, marking a new classification methodology, through an index in which, besides the number of dead animals are often considered the time of death and the capacity of strains cause lesions compatible with colibacillosis in chicks of 1 day old. There was significant difference between samples from cellulitis and respiratory symptoms compared to samples from litter in the proposed method, besides the fact that there is also the same relationship between the type and number of lesions formed depending on the origin of the isolate. We obtained also a database generated from this first experiment, which allowed the use of Artificial Neural Networks in the construction of models that simulated the same pathogenicity test, without the use of animals, taking as input information some main virulence factors associated with pathogenic samples, origin of samples and pathogenicity index obtained. The results regarding the predictions have been around 80.00%. These results show that neural networks can be an alternative to replace pathogenicity tests *in vivo* in the classification of samples of *E. coli* of avian origin.

1 INTRODUÇÃO

A importância da avicultura na atividade agropecuária nacional fica evidente, quando traduzida em números. O país hoje é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango e o maior exportador nesse segmento, totalizando, até o fim do ano passado, 3,6 milhões de toneladas de carne. Apesar da crise econômica mundial em 2008, o país registrou um aumento de 11,00% no volume de carne de frango destinada ao mercado externo, o que gerou 6,9 bilhões de dólares em renda para o país, sendo responsável por 1,5% do Produto Interno Bruto (ABEF, 2008).

O país exporta, no momento, para 152 países em todos os continentes, totalizando 2,32 milhões de toneladas de carne de frango. Dentre os principais parceiros, destacam-se a União Européia, Oriente Médio e Ásia, para onde foram exportados, respectivamente, 351.479 mil, 754.721mil, 739.632 mil toneladas de carne frango.

Porém devemos considerar também a importância do mercado interno, que consome 71,00% da carne de frango produzida no país é destinada ao mercado interno, que também tem sua importância. O brasileiro reconhece a carne de frango como fonte de proteína nobre e barata e consumiu no ano de 2009 em torno de 38,7 kg/hab.

O sucesso dessa atividade é garantido principalmente pelo sistema de integração, que possibilita que milhares de pequenos produtores tenham acesso à moderna tecnologia de produção, ao processamento e à comercialização do produto final pelas grandes indústrias.

Embora os lucros e crescimento dos atuais modelos de produção sejam imensos, os problemas, se não forem trabalhados com destreza, também possuem dimensões proporcionais aos ganhos.

As doenças que prejudicam a qualidade final do produto são sempre lembradas e, entre elas, destaca-se a colibacilose. A *Escherichia coli*, agente causador dessas lesões, por muito tempo esquecida como potencial patógeno, começa a ser vista sob nova ótica, devido aos prejuízos econômicos que gera. No Brasil, entre 2001 e 2005, somente a condenação total e parcial de carcaças, pelo Serviço de Inspeção Federal, devido à presença de lesões atribuídas a *E. coli*, gerou um prejuízo estimado em US\$ 58 milhões à avicultura. Deste total, US\$ 19 milhões deveram-se à presença de lesões cutâneas de celulite e US\$ 39 milhões ocorreram por lesões sistêmicas (Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006).

Por mais que a Indústria se preocupe e esteja freqüentemente investindo, montando laboratórios, com um infinidade de ferramentas para o diagnóstico, como testes sorológicos, ensaio imuno-enzimático (ELISA), biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), para a verificação da saúde do plantel e do controle de qualidade dos seus produtos, existem alguns senões, que ainda persistem. Por exemplo, no exame bacteriológico positivo para o isolamento de *E.coli*. Embora a biologia Molecular tenha evoluído muito na compreensão da patogenicidade frequentemente identificando genes relacionados com a capacidade de invadir, multiplicar e persistir no hospedeiro, além de testes *in vivo* para mensurar a real patogenicidade de uma amostra de *E.coli*, ainda não existe uma metodologia única e definitiva para classificar uma *E.coli* como patogênica ou não.

Ainda no que tange à patogenicidade da *E.coli*, não que a informação gerada seja de má qualidade, existem Fatores de Virulência que são frequentemente associados a *E.coli* com sucesso, como por exemplo: a capacidade de adesão, a multiresistência a drogas antimicrobianas, a produção de aerobactina e outros sistemas de aquisição de ferro, a produção de toxinas, principalmente as colicinas, a resistência sérica, a motilidade, a produção de hemolisinas e antígenos capsulares (Barnes & Gross, 1997). As publicações científicas atuais tendem a associar a presença de genes de eleição com um teste *in vivo* para que essa bactéria seja considerada patogênica.

Os testes em animais proporcionam um conhecimento da real capacidade da bactéria invadir, colonizar e se replicar em seu hospedeiro. Não se pode afirmar somente através do perfil genético que os genes contidos na bactéria venham a se expressar e causar alguma doença. Deve ser acrescentado que interação entre a presença de dois, ou mais genes não pode ser visualizada em provas *in vitro* (MOURA *et al.*, 2001). Além do fato de que ,na verdade, um gene isolado não faz essa amostra patogênica ou não ,sendo a interação entre esses o que realmente determina essa condição (KHUNERT, 2000) e gerando ,assim, diversas combinações possíveis. Por outro lado os laboratórios de diagnóstico e de pesquisa, por uma questão ética, deverão adaptar-se às novas limitações na experimentação que utiliza animais . Desta forma, o desenvolvimento de metodologias alternativas deve ser procurado

A Rede Neural Artificial (RNA) é um sistema de processamento de informações que apresenta certas características em comum com as redes neurais biológicas. Basicamente, estas características são formuladas através do estudo da célula fundamental do cérebro, o neurônio, e reproduzidas através de algoritmos que procuram simular o funcionamento de um conjunto de neurônios. Essas unidades , os “neurônios”, geralmente, são conectadas por canais de comunicação que estão associados a determinado peso. O comportamento inteligente de uma Rede Neural

Artificial vem das inúmeras interações possíveis entre as unidades de processamento da rede.

A principal característica das Redes Neurais Artificiais (RNA) é sua habilidade em aprender com o ambiente. Esse aprendizado é adquirido de situações reais às quais as redes devem ser apresentadas. Outra vantagem na adoção de RNA é a possibilidade de se utilizar dados qualitativos e quantitativos no mesmo modelo, sem que haja a necessidade da transformação desses dados, para a estatística convencional, além da possibilidade de realizar análises de dados não lineares e multivariados, característica comum em fenômenos biológicos, o que torna as RNA uma ferramenta apropriada para tratarmos dessa zona cinzenta que é a patogenicidade da *E.coli*.

A presente Tese objetiva realizar o traçado da patogenicidade de um grande número de amostras de *E. coli* isolados da cama dos aviários, de quadros respiratórios e de lesões cutâneas de frangos de corte em uma mesma região do sul do Brasil. A associação entre os dados da inoculação de pintos de 1 dia e as Redes Neurais Artificiais permitiram construir modelos, que simulem esse mesmo teste para novas amostras da bactéria, sem a necessidade de recorrer ao sacrifício de outros animais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria pertencente a família das Enterobacteriaceae, possui morfologia de bacilo curto, gram negativo, não esporulado e mede de 2 a 3µm de comprimento por 0,6 µm de largura. Em sua maioria, são móveis e o fazem através de flagelos peritríquios (BEER,1988).

Possui metabolismo aeróbico e anaeróbio facultativo, cresce em temperaturas de 18 a 44° C, porém sua temperatura ideal de crescimento é de 37° C. Nas provas bioquímicas é positiva para vermelho de metila (VM) e catalase e negativo para Vogues Proskauer (VP) e oxidase. Não é capaz de utilizar a uréia como única fonte de nitrogênio, descarboxila os aminoácidos arginina, lisina e ornitina e possui, como principal característica, fermentar glicose produzindo ácido e gás (GYLES, 1994).

No ano de 1947, Kauffman propôs um esquema de classificação baseado no perfil de três antígenos bacterianos, através de provas sucessivas de soroaglutinação. O antígeno flagelar “H” pode ser identificado pela seqüência de aminoácidos que compõe a unidade fundamental do flagelo, a flagelina. Essa, não resiste ao tratamento térmico de 100° C, tornando-se instável. Já o antígeno somático “O” compõe o corpo da bactéria e possui estabilidade após tratamento térmico. Por outro lado, o antígeno “K” que faz parte da cápsula bacteriana quando presente em quantidade suficiente possui função antifagocitária. Inicialmente, se conhecia 25 antígenos “O”, 55 antígenos “K” e 20 antígenos “H”. Atualmente, são conhecidos 173 antígenos “O”, 103 antígenos “K” e 56 antígenos “H” (BETTELHEIM & THOMAS,2006) e, freqüentemente, se desenvolvem pesquisas em que se associa uma doença a um certo sorogrupo de *E.coli*.

Sua distribuição é cosmopolita e esta bactéria é o principal habitante do trato gastrointestinal de mamíferos e de aves. Nos aviários é possível encontrar 10⁹

UFC/grama de fezes e 10^6 UFC/grama estarão presentes na poeira, tornando praticamente impossível a eliminação deste agente no ambiente (HARRY & HEMSLEY, 1965).

2.2 A colibacilose aviária

A Colibacilose é a denominação comum a diferentes grupos de lesões causadas pela bactéria *E.coli* com propriedades patogênicas, presentes no meio ambiente e/ ou em animais doentes. São lesões comuns entre as aves domésticas: aerossaculite, pericardite, peritonite, onfalite, salpingite, sinovite e celulite. São três as formas de entrada na qual a *E.coli* pode chegar às vias respiratórias do animal: danificando o trato respiratório superior, ou associando-se a algum fator que o tenha produzido, e ou através de imunodepressão anterior (NAKAMURA *et al.*, 1992). Na celulite onde a bactéria penetra, através de um arranhão na pele e a partir daí lesionar o tecido subcutâneo. Além da infecção via saco da gema a *E.coli* necessita de um fator que a torne potencialmente patogênica (BARNES & GROSS, 1997).

A síndrome respiratória acomete frequentemente aves de 2 a 12 semanas de idade. Normalmente, o lote apresenta alta morbidade e baixa letalidade, porém existem casos nos quais a doença se complica e pode se observar uma alta letalidade. As aves doentes apresentam estertores respiratórios, secreção nasal de composição variável, retardo no crescimento e diminuição nos índices de conversão alimentar. (FERREIRA & KNÖBL, 2000).

Uma vez inalada, a bactéria necessita aderir ao epitélio traqueal e esse momento é fundamental para que se desenvolva a doença. A partir daí, ocorre a colonização e a invasão de outros órgãos, provocando quadros de septicemia e de lesões como a pericardite e periepatite. Portanto, a ciliostase causada por um agente primário como o pneumovírus aviário, o vírus da bronquite infecciosa, a Doença de Newcastle, entre outros, favorece a instalação da colibacilose. A associação entre a *E.coli* e um, ou mais, agentes infecciosos gera um quadro respiratório denominado doença crônica

respiratória. Outro quadro que pode ser observado é a Síndrome da Cabeça Inchada. Nela, ocorrem edema de face, celulite facial e secreção óculo-nasal. A bactéria pode aproveitar-se de quadros provocados por agentes não infecciosos, como excesso de amônia no ambiente e falta de ventilação e aumentar o dano aos animais. (BARNES & GROSS, 1997).

2.3. A celulite aviária

A celulite é uma inflamação purulenta e difusa que acomete o tecido subcutâneo, embora se manifeste em vários planos teciduais. Na superfície da pele, pode ser observado um espessamento de coloração acastanhada, ou vermelho amarronzada, o que torna a lesão fácil de ser visualizada na linha de abate. A celulite pode vir acompanhada de crostas, de hiperemia e de uma lesão semelhante a um “favo de mel”. Quando a pele é removida, nota-se um variado grau de edema subcutâneo e de exsudato, podendo aprofundar-se até a musculatura. Neste local, causará hemorragias em forma de petéquias. A principal característica da celulite, é a presença de uma placa fibrinopurulenta de consistência sólida (MESSIER *et al.*, 1993; ELFADIL^c *et al.*, 1996; FALLAVENA *et al.*, 2000)

Na microscopia óptica, a celulite é caracterizada por hiperqueratose moderada e hiperplasia de epiderme. A derme apresenta espessamento fibroso e neovascularização, além de infiltração difusa de heterófilos e de linfócitos. Alguns animais ainda apresentam granulomas e invasão de células inflamatórias no tecido subcutâneo. Também, podem ser observados os capilares da musculatura congestos. Observam-se grumos bacterianos com células inflamatórias próximas às camadas de fibrina. Esse conteúdo fica circundado por uma cápsula de tecido conectivo contendo heterófilos, linfócitos e macrófagos (MESSIER *et al.*, 1993; PEIGHAMBARI^a *et al.*, 1995; ONDERKA *et al.*, 1997).

2.3.1 Caracterização das lesões de celulite

Lesões de celulite em abatedouros são descritas da seguinte forma: possuem área de 1 x 2 cm² a 4 x 10 cm² e com espessura de 3-5 mm, porém, em alguns casos, pode ser observada uma massa semi-sólida com superfície de 1 x 2 cm. (GOMIS^a *et al.*, 1997). Em experimentos que visam induzir a lesão em aves com mais de 20 dias de idade as características das lesões são as mesmas das observadas em abatedouros; (JEFFREY *et al.*, 1999).

Observando a localização de lesões ao abate Elfadil^c *et al.*, (1996) e Fallavena *et al.*, (2000), este último trabalhando com dados brasileiros, obtiveram resultados semelhantes, quanto à localização destas mesmas lesões nos animais. Os primeiros autores ao observarem 295 carcaças com celulite, encontraram a seguinte distribuição de lesões: abdome (89,7%), coxa (5,8%) e dorso (1,0%). Fallavena *et al.*, (2000) também verificaram resultados semelhantes encontrando em 340 amostras de celulite a seguinte distribuição: abdome (80,66%), coxa (9,6%) e dorso (2,2%). Depois de analisar 340 carcaças de frango condenadas por celulite, Fallavena *et al.*, (2000) notaram que algumas lesões freqüentemente acompanhavam a lesão principal, tais como espessamento de pele (86,18%), coloração amarelo-acastanhada de pele (61,05%), aparência do tipo “waffle” da derme, erosão e úlcera (25%), arranhões (72,09%) e crostas (18,5%) na epiderme.

2.3.2 Etiologia da celulite aviária

A celulite aviária é uma doença de etiologia multifatorial, pois são necessários, pelo menos, dois fatores para a sua ocorrência. Em primeiro, está a necessidade de que um trauma qualquer resultar em ferimento na pele, independente da razão, em segundo a presença maciça de contaminação bacteriana por *E.coli* (NORTON *et al.*, 1997). Os fatores de risco que levam ao trauma são diversos e resultam no aparecimento da celulite. A densidade, porque, quanto mais agrupados estiverem os animais, maior

será o contato e a competição entre eles. A proporção entre machos e fêmeas, já que machos são mais agressivos e possuem um tempo de empenamento mais tardio em comparação com as fêmeas. Assim sendo, ficam mais vulneráveis, pois as áreas cobertas por penas são mais protegidas. A cama dependendo do material que seja composta. A palha, por exemplo, pode possuir extremidades pontiagudas que, por sua vez levariam ao trauma e, acrescentando-se, camas mal manejadas são verdadeiros sítios de crescimento bacteriano, inclusive para a *E. coli* (ELFADIL^b *et al.*, 1996).

Também são fatores relacionados à celulite o diâmetro de superfície do peito, a velocidade em ganho de peso, o uso de probióticos que ao inibirem as bactérias gram positivas, podem favorecer a propagação da *E. coli* e o manejo alimentar. Algumas patologias podem aumentar a incidência de celulite em um lote, entre elas estão a ascite e as deformidades valgus e valrus, doenças que dificultam a mobilidade do animal (ELFADIL^b *et al.*, 1996).

2.3.3 Lesões de celulite concorrentes com outras causas de condenação por colibacilose

Ordenka *et al.*, (1997) analisaram a prevalência de lesões de celulite e de outras lesões sistêmicas associadas em uma mesma carcaça. Constataram que 12,5% dessas carcaças possuíam ao menos uma lesão, além da celulite. Os mesmos autores, ainda citam que os 30,5% de prevalência de lesões de colibacilose encontrados por Gomis^a *et al.*, (1997), provavelmente, estariam ligados ao baixo número de lotes observados.

Esses resultados levam a questionar se a *E. coli* que gera celulite é a mesma que origina outras formas de colibacilose. Dois estudos transversais, um com 118 e outro com 236 carcaças condenadas por celulite, chegaram aos seguintes resultados: 36% das carcaças do primeiro estudo apresentavam outras lesões de colibacilose concomitante com a de celulite. No segundo experimento, o mesmo autor constatou que em 34,6% das carcaças havia, ao menos, mais uma lesão de colibacilose, além da lesão de celulite. Essas lesões eram pericardite (19/237), aerossaculite (21/237),

osteomielite (26/237), polisserosite (4/237) e perihepatite (4/237). Essas últimas amostras de *E.coli* foram testadas verificando-se o perfil genotípico e fenotípico e se mostraram diferenças quanto aos fatores de virulência, indicando que a celulite não leva à manifestação de outras colibaciloses e nem as colibaciloses levam à celulite. O que existe, na verdade, são fatores de risco em comum entre a celulite e as outras formas de colibacilose (GOMIS^a *et al.*, 1997; GOMIS *et al.*, 2000).

A *E.coli*, é a principal bactéria isolada da maioria das lesões de celulite. Em um estudo que utilizou 115 carcaças, 97,5% eram amostras de *E.coli* e foram associados os sorogrupos O₇₈, O₂, O₁ e O₈₅ ao aparecimento da celulite. Nesse mesmo trabalho, 60% das amostras isoladas pertenciam aos quatro sorogrupos citados. Entretanto, outros agentes foram, eventualmente, isolados das lesões e houve o registro da presença de *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus vulgaris* e *Streptococcus dysagalactiae* (PEIGHAMBARI^b *et al.*, 1995).

2.3.4 A celulite aviária e os riscos à saúde pública

É importante ressaltar que nunca houve associação entre um caso de intoxicação alimentar no homem e a presença de celulite aviária. Entretanto, existe semelhança entre o perfil genético da *E.coli* proveniente de celulite e a mesma bactéria causadora de septicemia e meningite em humanos. Existe o risco da *E.coli* de origem aviária servir de banco de genes de resistência para os patógenos presentes em humanos (KUMOR *et al.*, 1998). Ao se compararem bactérias provenientes de amostras de celulite e de aerossaculite com amostras de pacientes doentes de uma mesma região geográfica, concluiu-se que as *E.coli* aviárias diferiam, fenotípica e genotipicamente, das que causavam doenças nos humanos (CAYA *et al.*, 1999).

A *E.coli* também desempenha papel fundamental para que ocorra a celulite. Admitindo-se que somente 10 a 15% das *E.coli* presentes nas fezes causam algum tipo de doença, esse grupo de bactérias patogênicas, provavelmente, possui fatores de

virulência que as diferenciam das não patogênicas. Esse conjunto de bactérias capazes de produzir dano aos animais recebeu a denominação de *E.coli* Patogênicas às Aves (HARRY & HEMSLEY, 1965; GYLES, 1994).

A realização de testes fenotípicos e genotípicos propicia o conhecimento dos principais fatores de virulência da *E.coli*. Entretanto, as publicações científicas atuais tendem a associar a presença de genes de eleição com um teste *in vivo* para que essa bactéria seja considerada patogênica. Os testes em animais proporcionam um conhecimento da real capacidade da bactéria invadir, colonizar e se replicar em seu hospedeiro. Não se pode afirmar somente através do perfil genético que os genes contidos na bactéria venham a se expressar e causar alguma doença. Deve ser acrescentado que interação entre a presença de dois, ou mais, genes não pode ser visualizada em provas *in vitro* (MOURA *et al.*, 2001).

2.4 Fatores de virulência

Por muito tempo, o critério *in vitro* para determinação da patogenicidade foi baseado na identificação de antígenos flagelares capsulares e somáticos das *Escherichia coli* patogênicas para aves (APECs). Principalmente a identificação do antígeno somático “O”, sendo os sorogrupos mais isolados de casos de colibacilose O₁, O₂, O₂₅, O₇₈, O₁₁₅ e O₁₆₁, embora várias amostras, muitas vezes, nem possam ser classificadas dessa forma, sendo consideradas intipificáveis e até hoje não se compreenda completamente de que maneira essas propriedades contribuem para a patogenicidade. A sorotipagem ainda hoje deve ser considerada como ferramenta, pois reduz para pequenos grupos o número de *E.coli* patogênicas em comparação às milhares de combinações possíveis por esse sistema. (ALTEKRUSE *et al.*, 2002)

Atualmente, a caracterização laboratorial das amostras de *E.coli* avança cada vez mais para um melhor entendimento da epidemiologia e patologia da mesma. Muitas linhas de pesquisa buscam mais características associadas a patogenicidade que diferenciem essa *E.coli* nesse sentido entre eles, a pesquisa dos antígenos

somáticos, características bioquímicas, susceptibilidade a anti-microbianos e as mais variadas técnicas de biologia molecular na identificação dos Fatores de virulência (LA RAGIONNE, 2002).

Os chamados fatores de virulência (FV) podem ser definidos como qualquer propriedade bacteriana que favoreça a invasão, colonização ou persistência no hospedeiro. O que tem sido feito nos últimos anos é identificar fatores de virulência pesquisados *in vitro* ou através de técnicas de biologia molecular e compará-los quanto à presença em amostras classificadas como patogênicas e não patogênicas. Dentre os FV mais pesquisados estão: a capacidade de adesão, a multiresistência a drogas antimicrobianas, a produção de aerobactina e outros sistemas de aquisição de ferro, a produção de toxinas, principalmente as colicinas, a resistência sérica, a motilidade, a produção de hemolisinas e antígenos capsulares (PEIGHAMBARI^b, 1995; JANSEN, 2001).

O que está sendo notado quanto à virulência bacteriana é que amostras isoladas de casos clínicos e, portanto, consideradas patogênicas, possuem perfis de virulência mais similares, provavelmente originária de poucos grupos clonais, do que quando comparadas a amostras isoladas de origem fecal, assim permitindo que poucas cepas de *E.coli* possam causar uma significativa parte das infecções (LA RAGIONNE, 2000; MOURA, 2001). Embora, Trampel, et al, 2007, tenham identificado amostras APEC de mesma origem filogenética dentro de um mesmo lote, esse achado não se repetiu entre lotes de uma mesma propriedade.

O fato é que a patogenicidade é um fenômeno multifatorial que envolve também um grande número de interações com o hospedeiro e o ambiente e que ainda não há uma metodologia padrão para determinação dessa característica.

A capacidade da bactéria em aderir ao epitélio do hospedeiro é o passo inicial para o desenvolvimento das infecções. A habilidade da *E. coli* em produzir fímbrias

confere especial vantagem em termos de adesão e colonização (Dho & Lafont, 1982; Dho & Lafont, 1984; Pourbaksh^b,1997) .

As fimbrias, ou pili são filamentos protéicos formados por subunidades peptídicas com diferentes pesos moleculares e especificidade sorológica. As adesinas são as unidades estruturais da fimbria, que atuam como fatores de aderência e colonização de células eucariontes (Naveh et al., 1984). Uma vez estabelecidas ligações mecanicamente estáveis entre as bactérias e as células do hospedeiro , sua especificidade permite às bactérias a fixação, possibilitando a superação dos mecanismos fisiológicos de defesa do hospedeiro, colonizando e multiplicando-se (Smyth et al., 1994).

Fimbrias podem ser classificadas pela capacidade de aglutinar hemácias de diferentes espécies. Sendo divididas em fimbrias que a D-manose não é capaz de inibir o processo de hemaglutinação, sendo essas denominadas D-manose resistentes e, caso contrário, são chamadas D-manose sensíveis. (Orskov & Orskov, 1983).

A fimbria P é uma adesina D-manose-resistente, que é um grupo de estruturas bacterianas que se liga a carboidratos presentes nos receptores celulares, que não a D-manose. A fimbria P liga-se especificamente ao carboidrato α -D galactose e β -D galactose do antígeno do grupo sanguíneo P, presente nas hemácias humanas (Hoschützky et al., 1989). Essa mesma Fimbria é conhecida pela capacidade de aderir ao trato urinário humano e saco aéreo das aves, entretanto parece não estar envolvida nos momentos iniciais da infecção, na adesão aos sacos aéreos superiores das aves, sendo relacionada a estados de infecção mais tardios na colonização de órgãos e septicemia. (La Ragione, 2002).

A fimbria P é um heteropolímero constituído de uma subunidade maior denominada *pap A*, constituindo o corpo da fimbria e três subunidades menores, *pap E*, *pap F* e *pap G*, que estão diretamente relacionadas à aderência; *pap H* é responsável pela terminação e implantação da fimbria na superfície celular. *Pap C* e

pap D são requeridos para a polimerização e transporte das subunidades fimbriais, respectivamente. *Pap G* é a molécula de adesina que confere especificidade nas ligações. (POURBAKSH^a,1997).

A fimbria F11 é codificada pelo *operon fel A*, é uma variante sorológica da fimbria P, que apresenta atividade hemaglutinante com eritrócitos de ovinos e humanos em presença de D-manose. Muitas vezes a *E.coli* que possui o gene que codifica esse FV, mas não expressa em condições experimentais nos estágios precoces da infecção, essa tende a se manifestar mais durante a invasão dos órgãos internos e pode também estar relacionada a persistência e resistência a fagocitose (De Ree et al., 1985; Pourbaksh^a,1997).

O ferro é um elemento fundamental para o crescimento bacteriano. Embora possa ser encontrado em altas concentrações nos tecidos e fluidos corporais, a quantidade disponível é extremamente pequena. Nas condições fisiológicas, ele se encontra ligado a glicoproteínas ou está em formas insolúveis. A *E. coli* utiliza o ferro no transporte de oxigênio, síntese de DNA, transporte de elétrons e no metabolismo do peróxido. Para superar esta limitação, a bactéria pode possuir sistemas especiais de assimilação, através dos quais ela capta o ferro necessário via componentes ligantes de ferro de baixo peso molecular os sideróforos (Neilands, 1981; Neilands et al., 1985)

As *E. coli* podem efetuar o transporte deste mineral por meio dos sistemas ferricromo, citrato, enterobactina e aerobactina, sendo este último o mais associado a amostras APEC. Este sideróforo é excretado ao meio e se liga ao íon férrico formando um complexo estável, através do qual o ferro é transportado para o citoplasma via componentes específicos das membranas externa e interna. É importante salientar que a aerobactina, após cumprir sua função, é reciclada continuamente no interior da célula e exportada para carrear outro íon ferro o que implica em economia de energia (Braun, 2003; Rohrbach et al., 1995; Woodrow et al., 1978). São cinco os genes aerobactina 4 genes relacionados a biossíntese *iucA*, *iucB*,

iucC e *iucD* e gene *iutA* codifica uma proteína receptora de membrana externa (Bindereif & Neilands, 1985).

Alguns grupos de coliformes são capazes de produzir substâncias que causam a morte de outras amostras de coliformes, denominando-as de colicinas (Luria & Suit, 1987; Hedges, 1990). A importância da produção de colicinas por bactérias invasivas, no processo de colonização, está relacionada à competição com a microbiota normal, presente nos tratos respiratório e gastrointestinal. (Gilson et al., 1987; Wooley^a et al., 1994).

A colicina V, entre esse, grupo, de toxinas, é a mais pesquisada nas amostras (APECs), sendo encontrada principalmente em bactérias virulentas implicadas em infecções extra-intestinais em humanos e animais. É uma molécula pequena e não é liberada da célula bacteriana através de sua lise, como ocorre com as demais, mas através de mecanismo de exportação (Gilson et al., 1987; Lior, 1994).

Smith (1974) observou que os plasmídios colicina V poderiam aumentar a invasibilidade, pois a eliminação dos mesmos reduzia a patogenicidade e sua reintrodução na bactéria restaurava a patogenicidade. Não se pode atribuir um efeito patogênico direto aos genes que codificam a colicina V. No entanto, várias propriedades fenotípicas que incluem resistência sérica (Binns et al., 1979), presença de antígeno capsular K1 (MONTGOMERIE et al., 1984), produção de aerobactina estão associadas a amostras positivas para o gene *E. coli* pCol, isoladas de bacteremias (LIOR, 1994; VIDOTTO, 1991).

Outro FV da *E. coli* muito investigado é o gene TSH relacionado a propriedade de aderência bacteriana através de uma adesina não fimbrial. O gene que codifica a atividade hemoaglutinante D-manose resistentes, entre 26°C e 30°C, sendo assim denominada de Hemaglutinina Temperatura Sensível. Sua participação na patogenicidade de amostras de origem aviária ainda necessita de mais estudos, o que se sugere é que esse FV participe do processo de lesão em saco aéreo e que não seja

necessário no processo posterior de septicemia (Delicato et al, 2002). Alguns autores associam a presença deste gene a amostras isoladas de aves com quadros de colisepticemia com alta mortalidade e ausência em fezes da aves saudáveis. (La Raignonne, 2002 ; Rocha, 2006)

Após se fixar na microbiota, a *E.coli* invade os tecidos e tem maior contato com o sangue, estando a partir daí a bactéria susceptível à ação bactericida do soro através, principalmente, do sistema complemento. O sistema complemento é composto por um conjunto de proteínas plasmáticas que agem de forma ordenada através de um mecanismo em cascata e que atuam na defesa contra infecções, sem a necessidade do desenvolvimento de resposta imune específica celular, eliminando, assim, os microrganismos invasores, através da liberação de sub-componentes que atuam efetivamente como mediador na resposta inflamatória provocando a morte bacteriana. (Rocha et al 2006; Tizard , 1995).

A resistência ao soro foi definida por Taylor em 1983 como sendo a propriedade de uma amostra bacteriana, no início de sua fase logarítmica de crescimento, de ser totalmente insensível a uma alta concentração de soro. Tanto o gene KpS quanto Iss estão relacionados a essa característica e são frequentemente isolados de quadros de colibacilose.

O gene kps é o responsável pela codificação dos antígenos capsulares K1 e K5 (Johnson et al., 2005), pelas superfícies estruturais polissacarídicas (LPS) da cápsula, de outras membranas protéicas e pela presença de proteínas de membrana externa (Gross, 1994) que estão relacionadas à resistência ao soro. A presença de polissacarídeos de cápsula tem propriedades anti-fagocítica e protege a bactéria contra lise do complemento do soro por não permitir uma inserção estável (Joiner et al., 1983)

O gene Iss também atua na resistência sérica, não permitindo que o complexo terminal do sistema complemento que atua na membrana celular se ligue a esta

causando lise da célula (Binns et al., 1982). Chuba et al., (1986), observou que a presença do gene (Iss) aumentava em 20 vezes a capacidade bacteriana de resistência sérica.

Com relação a identificação de genes ligados à patogenicidade de amostras de *E.coli* de origem respiratória Rocha *et al.*,(2002) constataram que nas 63 amostras investigadas eram freqüentemente expressos os seguintes fatores de virulência: produção de colicina, resistência sérica, a presença do operon *pap* e capacidade de hemaglutinar hemácias de galinha. Embora quando esses fatores de virulência foram analisados em conjunto a variação de combinações foi muito diversa, caracterizando assim que, no campo, as amostras possuem perfis muito diversos para obedecerem a um padrão.

2.5. Testes de patogenicidade

Normalmente, os testes de patogenicidade se dividem em quatro categorias: o teste em animais com mais de 15 dias de vida, os ensaios em pintos de um dia, o teste de dose letal 50% e a inoculação em ovos embrionados.

O teste em animais com mais de 15 dias de vida tem por objetivo reproduzir a lesão de celulite já os ensaios em pintos de um dia, ou com idade próxima a esta, levam os pintinhos à morte e a uma série de lesões sistêmicas. Essa última alternativa é mais utilizada quando associada a experimentos envolvendo o estudo do perfil genético. A inoculação em pintos também é utilizada para estabelecer a concentração em unidades formadoras de colônia suficientes para matar 50 % dos animais inoculados (DOZOIS *et al.*, 1992; NGELEKA *et al.*, 2002; DELICATO *et al.*, 2003).

A inoculação em ovos embrionados surge como uma nova alternativa para modelos de patogenicidade *in vivo*. Ao relacionarem essa nova modalidade de inoculação com métodos já empregados, através das vias endovenosa, subcutânea e intratraqueal, foi possível observar uma forte correlação entre o desafio em ovos

embrionados e a alta mortalidade quando se empregavam as vias subcutânea e intravenosa. A via intratraqueal mostrou baixa letalidade em relação a outras vias de inoculação, embora entre as amostras utilizadas na via intratraqueal tenham ocorrido diferenças nos quadros de mortalidade e morbidade. Esses achados estariam relacionados com o potencial individual de cada amostra em causar doença (GIBBS *et al.*, 2004).

Dentre os autores que trabalham com testes de patogenicidade em animais jovens é comum o uso do conceito de dosagem letal a 50% (LD50), que significa a dose necessária para que morram 50% dos animais inoculados. Para mensurar a patogenicidade de lesões de celulite é comum o uso da via subcutânea (SC). (DOZOIS *et al.*, 1992; NGELEKA *et al.*, 2002). Já para testes usando cepas de lesões respiratórias, ou de colisepticemia, a via mais comum é através dos sacos aéreos (POURBAKHS^b *et al.*, 1997; DOZOIS *et al.*, 2000; ASSIS, 2001).

O que caracteriza os testes de patogenicidade de *E.coli* em pintos de um dia de idade com amostras provenientes de lesões de celulite é que, embora se consiga reproduzir as lesões de celulite, o que, freqüentemente, se observa é a alta mortalidade nos primeiros dias após a inoculação da bactéria e a presença de lesões septicêmicas no pintinho (NORTON,2000). A septicemia aguda por *E.coli* mata as aves em bom estado corporal e, normalmente, sem lesões macroscópicas, o que indica a natureza aguda da infecção. Quando encontradas, as lesões observadas são o fígado esverdeado e pontos necróticos, a musculatura peitoral congesta (BARNES & GROSS,1997).

Johnson *et al.*, (2001) ao inocularem aves com diferentes idades (4, 7, 10, 16, 28 e 52 dias) observaram que esses animais apresentaram celulite em todas as idades, porém as aves entre 4 e 16 dias apresentaram lesões características de outras formas de colibacilose e alta mortalidade até 2 dias após a inoculação.

Um dos primeiros experimentos realizados para comparar amostras patogênicas e apatogênicas de *E. coli* foi executado por Dho & Lafont., (1982). O

trabalho tinha como objetivo relacionar índice de letalidade em pintos de 1 dia, capacidade de adesão e resistência sérica. Esses mesmos autores utilizaram grupos de 5 pintos de 1 dia e inocularam 0,1 ml de solução de caldo cérebro coração (BHI) contendo 10^9 UFC/ml *E.coli*, através da via subcutânea. A partir daí, os animais foram observados por 4 dias e registrado o índice de morte a cada 24 horas.

Animais que recebem *E.coli* patogênica provenientes de lesão de celulite podem desenvolver a lesão em menos de 18 horas após a inoculação. Porém, após 6 horas do período pós-inoculação, já se pode observar uma lesão amarelo rosada de característica sero-sanguinolenta que, provavelmente, resultará na lesão de celulite, quando a infecção for resolvida. No experimento em questão, a persistência da lesão de celulite se manteve por um período de 3 semanas (NORTON *et al.*, 1997).

Gomis^b *et al.*, (1997) verificaram que ao inocular aves de 25 dias de idade com doses variando entre 10^9 UFC/ml a 10^5 UFC/ml por via (SC), em 6 horas após inoculação os animais exibiam sintomas respiratórios suaves. Neste período de tempo, foi encontrado no sangue contagens bacterianas oscilando entre 4×10^2 a 1×10^4 UFC/ml e foi registrado que o número de bactérias foi decrescendo com o passar do tempo, mas ainda se manteve contável por até 3 dias.

O isolamento da bactéria após inoculação é dependente do local de inoculação. Ou seja, é possível isolar *E.coli* de lesões de celulite até 14 dias após a indução da lesão. O tempo máximo para se isolar a bactéria do fígado, do sangue e do coração foi de 7 dias (POURBAKHS^b *et al.*, 1997). Embora a bactéria seja eliminada em poucos dias do organismo a infecção, quando resolvida, resulta em grande quantidade de fibrina nos órgãos acometidos. Devido ao curto período do ciclo de produção de frango de corte essas lesões provavelmente acompanharão o animal até o momento do abate (GOMIS^b *et al.*, 1997).

Cepas bacterianas oriundas de quadros respiratórios, inoculadas em aves com 12 dias de idade, na dose de 0,1 ml 10^8 UFC/ml, induziram o surgimento de sinais

respiratórios sutis algumas horas pós-inoculação. Na necropsia destes animais, já era possível visualizar edema nos sacos aéreos. Após 24 horas da inoculação, os animais já se mostravam moribundos ou morreram, apresentando lesões de aerossaculite com intensidade de moderada a severa e exsudato fibrino purulento (POURBAKHS^b *et al.*, 1997).

Na tentativa de explicar melhor a patogenicidade das amostras em estudo, os autores se valem de diversas formas de avaliação. Em razão disto, a literatura oferece uma grande variedade de métodos, majoritariamente baseados em critérios subjetivos e, conseqüentemente, de difícil reprodução.

Macklin *et al.*, (1999) ao desafiar em aves de 28 dias de idade por via SC, com uma dose de 1ml contendo 1×10^6 UFC/ml de *E.coli*, estabeleceram um critério de classificação das lesões que variou de zero a quatro. No escore zero não foram detectadas lesões de celulite. Já o escore 1, correspondia a lesão menor que 2cm de diâmetro e infiltração muscular mínima. No escore 2 era observado um quarto (1/4) do total do peito coberto por lesão de celulite e infiltração muscular moderada. O escore 3 estava representado pelas lesões que cobriam a metade da massa total do peito e podia ser visualizada infiltração muscular severa. Finalmente, no escore 4, o peito achava-se completamente tomado pela lesão e esta era acompanhada por severa infiltração muscular.

Peighambari^a *et al.*,(1995) ao avaliarem a função do trauma no desenvolvimento da celulite e relacionarem a capacidade de formar a lesão com amostras de diferentes origens, sugeriram que, baseado no aspecto macroscópico da lesão, poderia dividi-las em quatro grupos. No primeiro grupo colocaria as aves com ausência de lesão. O segundo, seria composto por animais com pele de coloração amarela suave, lesões cutâneas com menos de 5 cm^2 de área e ausência de hemorragia. No terceiro, poderiam ser observadas aves com pele de coloração amarela moderada, área de lesão entre 5 e 10 cm^2 e ausência de hemorragia. O quarto

grupo conteria os animais com severas lesões na pele com área maior que 10 cm² e presença de hemorragias.

Peighambari^a *et al*, (1995) desenvolveram conceitos de severidade de lesão microscópicas e se basearam em alterações na cápsula do tecido conectivo, contagem de células inflamatórias por campo e presença de neo-vascularização. Desta forma, “sem lesão” significaria ausência de tecido conectivo de cápsula, ausência de heterófilos, 1 a 2 linfócitos por campo e ausência de neo-vascularização. Na categoria “lesão leve” estariam os quadros histológicos caracterizados pelo domínio de tecido conectivo maduro composto por colágeno, menos de 10 heterófilos e 3 a 5 linfócitos por campo e ausência de neo-vascularização. Como “lesão intermediária” seriam classificadas as lesões histológicas que apresentassem quantidades iguais no tecido conectivo de tecido celular e tecido conectivo com colágeno, 10 a 50 heterófilos, 6 a 10 linfócitos e ausência de neo-vascularização. Por último, um quadro de “lesão severa” seria representado por grande quantidade de tecido conectivo jovem, mais de 50 heterófilos e 10 linfócitos por campo e presença de neo-vascularização .

Mellata *et al.*, (2003) ao inocularem aves com 25 dias no saco aéreo, desenvolveram um critério para classificar as lesões de septicemia. Para tanto, levaram em consideração as lesões presentes nos sacos aéreos, no fígado e no coração. O escore proposto era construído da seguinte maneira: saco aéreo (0- normal; 1- leve edema; 2- espessamento difuso, neovascularização e exsudato fibrinoso leve; 3- exsudado fibrinoso moderado e 4- exsudato fibrinoso severo). As lesões cardíacas foram agrupadas como: 0- sem lesão; 1- líquido pericárdico turvo; 2- pericardite aguda . O último grupo dizia respeito às lesões hepáticas que foram assim divididas: 0- sem lesão; 1- pequena quantidade de exsudato e 2- perihepatite marcada.

Jeffrey *et al.*, (1999) além de empregarem critérios quantitativos para medir a lesão de celulite e a lesão de órgãos, acrescentaram uma nova variável ao seu método, o tempo de formação da lesão. Assim sendo, foram inoculadas aves aos 22 dias de idade por via SC com, aproximadamente, 1ml de solução bacteriana contendo 10⁷

UFC/ml. Após a inoculação, as aves foram observadas e necropsiadas em 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas p.i. Quanto mais precoces fossem as lesões de celulite, mais pontos eram atribuídos a elas. Portanto, o quadro podia ser resumido assim: escore 0- sem lesão aparente; escore 1- leve opacidade e espessamento do tecido subcutâneo; escore 2- espessamento unilateral moderado, exsudato fibrinopurulento e hemorragia petequiral; escore 3- exsudato fibrinopurulento tendendo para fibrinocaseoso com hemorragias equimóticas na musculatura e lesão disseminada por todo o lado onde ocorreu a inoculação; escore 4- similar ao escore 3 com predomínio de exsudato fibrinocaseoso e lesão além da linha média peitoral; escore 5- similar ao escore 4, mas, além de se estender pela linha média, a lesão deve comprometer pelo menos a metade da musculatura do peito

Os mesmos autores classificaram as lesões septicêmicas em fracas, moderadas e severas, depois de observar o fígado, o coração e as articulações. O escore foi graduado de 1 a 5 e obedecia as seguintes normas: escore 1- uma ou duas lesões leves; escore 2- presença de uma lesão moderada em um órgão ou lesões suaves em 3 órgãos; escore 3- quando o animal apresentasse lesão moderada em dois órgãos; escore 4- quando as aves, ao menos, apresentassem uma lesão severa no fígado e articulação e coração com lesões moderadas e escore 5- quando mais de um órgão apresentassem lesões severas.

Mesmo em testes de patogenicidade que só envolvem a observação do número de animais mortos por um determinado período de tempo, os critérios para avaliar essas amostras são diversos.

Dho & Lafont., (1982) propuseram inocular 0.1 ml de solução pura de BHI contendo 10^9 UFC/ml, via subcutânea, em grupos de 5 animais e consideraram como cepa patogênica a que fosse capaz, de matar 3 de 5 animais do grupo inoculado e cepa apatogênica a que não matasse nenhum animal. Infelizmente, estes autores não relataram como classificariam amostras que matassem 1 ou 2 animais do grupo testado. Alguns anos depois, os mesmos autores em um outro experimento,

associaram a presença dos fatores de virulência, como a produção de aerobactina e a capacidade de adesão em células epiteliais, à diferenças na letalidade de diversas amostras. Foi usada a mesma metodologia quanto a via, dose e número de animais. Porém, o critério de classificação foi diferente da usada anteriormente. Agora, a amostra letal deveria matar todos os 5 animais inoculados, amostras intermediárias de 2 a 4 animais e não letais 0 ou 1 animal.

Knobl *et al.*, (2001) utilizaram a mesma metodologia proposta por Dho & Lafont, (1982) só que ao invés de utilizar cinco animais usaram oito e estabeleceram que: alta mortalidade mataria mais de 80% dos animais, intermediária de 50 a 80% dos animais e baixa patogenicidade menos de 40% dos animais.

Brito *et al.*, (2002), também usa a metodologia estabelecida por Dho & Lafont, (1982), observando 5 animais por 7 dias e considerou amostras de alta patogenicidade as que matassem mais de 80% dos animais, intermediária de 50 a 80%. Baixa patogenicidade de 50 a 10% e apatogênica que não matasse nenhum animal.

2.6 Redes Neurais Artificiais

A neuro computação teve início por volta de 1943, data em que McCulloch e Pitts publicaram artigos sugerindo a construção de uma máquina de funcionamento semelhante ao cérebro humano. Uma rede neural artificial (RNA) é um sistema de processamento de informações que apresenta certas características em comum com as redes neurais biológicas. Basicamente, estas características são formuladas através do estudo da célula fundamental do cérebro, o neurônio, e reproduzidas através de algoritmos que procuram simular o funcionamento de um conjunto de neurônios (BRION,1999)

Uma rede é composta por várias unidades de processamento - "neurônios" - ligadas por conexões sinápticas. Os neurônios podem ser divididos em 3 classes:

"neurônios" de entrada, que recebem estímulos do meio externo, "neurônios" internos ou ocultos e "neurônios" de saída, que se comunicam com o exterior e significam o fenômeno a ser predito. Essas unidades, geralmente, são conectadas por canais de comunicação que estão associados a determinado peso. O comportamento inteligente de uma Rede Neural Artificial vem das inúmeras interações possíveis entre as unidades de processamento da rede. (Kovacs, 1996).

A principal característica das Redes Neurais Artificiais é sua habilidade em aprender com o ambiente. Esse aprendizado é adquirido de situações reais às quais as redes devem ser apresentadas. Segundo Forsström & Dalton (1995), à medida que o aprendizado ocorre, o erro entre a saída da rede e a saída desejada diminui. Então, o conhecimento que a rede adquiriu fica codificado nos pesos das conexões entre neurônios. Devido à dificuldade em se traduzir essas informações de forma lógica, denominamos “camada oculta” esses neurônios intermediários entre a entrada e saída .

Outra vantagem na adoção de RNA é a possibilidade de se utilizar dados qualitativos e quantitativos no mesmo modelo, sem que haja a necessidade da transformação desses dados, para a estatística convencional, além da possibilidade de realizar análises de dados não lineares e multivariados, característica comum em fenômenos biológicos. As redes tornam mais acessível a profissionais de diversas áreas, principalmente das Ciências Biológicas, a utilização da modelagem matemática . (Salle, 2004)

Rocha (2006) cita que, ao fazer um levantamento bibliográfico no ano de 2006, havia 187 trabalhos na área de bacteriologia utilizando redes neurais. Destes, 46 trabalharam com *E. coli*. Outros microrganismos, como *Mycobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* entre outros, já começam a ser estudados por meio deste poderoso recurso. Nenhum dos trabalhos encontrados faz menção a amostras de origem avícola.

Na área avícola, os primeiros modelos que usaram redes foram publicados por Zhang et al. (1996) e Efadil et al. (1996). As primeiras pesquisas adotando modelagens matemáticas, nesta área no país, foram publicadas por Salle et al. (1999) e propunham a criação de um critério de interpretação para os resultados sorológicos, através de modelos matemáticos estatísticos. Nesse caso, equações de regressão relacionavam idade das aves e os títulos de anticorpos apresentados pelas mesmas para as doenças de Newcastle, Gumboro e bronquite infecciosa, nos anos de 1993 a 1995, através das análises de regressão lineares e não lineares. Em outra linha de pesquisa do grupo, as micotoxinas, também se sentia a necessidade de respostas que a estatística convencional não estava atendendo. Os modelos matemáticos foram então utilizados para correlacionar a presença de aflatoxina e ocratoxina em alimento e em vísceras de frangos de corte com os parâmetros produtivos do lote (Salle et al., 1999).

O Brasil abate bilhões de frangos de corte anualmente e a inspeção sanitária, como em muitas partes do mundo, é baseada unicamente em critérios visuais humanos. Trabalhos recentes, desenvolvidos nos Estados Unidos da América, propuseram a utilização de análise de imagens das carcaças, usando as redes neurais artificiais como geradoras do critério de aceitação ou de rejeição. Nos distintos experimentos realizados, analisavam-se não só a coloração da pele, mas, inclusive, sua textura. O método é confiável e a margem de acerto das predições está acima dos 95%, além de fugir do erro imposto pelo cansaço do agente de inspeção após repetidas observações (Park *et al.*, 1998; Chao *et al.*, 2002).

O uso de RNA vem sendo aplicada não só no ambiente de produção avícola como também na própria ave. Pesquisadores norte-americanos utilizaram a rede neural como uma predição probabilística de ascite em frangos de corte. As entradas utilizadas na rede foram nível de O_2 no sangue, peso corporal, eletrocardiograma (ECG), hematócrito, onda S e taxa cardíaca das aves. A conclusão foi que o uso dos modelos desenvolvidos pode incrementar o diagnóstico de ascite em frangos de corte.

Os resultados podem ser úteis na seleção de linhagens de frangos de corte que não tenham propensão à ascite. (Roush *et al.*, 1996; Roush *et al.*, 1997). A síndrome da hipertensão pulmonar dos frangos de corte também foi abordada através de RNA, na tentativa de relacionar padrões individuais de ganho de peso e a susceptibilidade dos animais a contraírem a enfermidade. (Roush *et al.*, 2000; Roush *et al.*, 2001).

No Centro de Diagnóstico de Patologia Aviária, há alguns anos, vem sendo desenvolvida uma linha de pesquisa que utiliza RNA. Em 2001, Salle *et al.* publicaram o primeiro trabalho utilizando a tecnologia das redes neurais artificiais onde foram estimados os parâmetros de produção de galinhas reprodutoras pesadas em recria. Em 2004, foi defendida por Reali uma dissertação de mestrado em que , com a utilização das redes neurais artificiais, foram estimados os parâmetros de produção de frangos de corte. Salle , em 2006, utilizou esta ferramenta na análise de parâmetros do incubatório e Pinto , no ano de 2007, aplicou essa mesma ferramenta para explicar fenômenos no abatedouro de frangos de corte.

Rocha (2006) relatou o desenvolvimento de um sistema de inteligência artificial (RNA) que correlacionava a presença de 7 genes que expressavam fatores de virulência, com um novo índice de patogenicidade calculado através da inoculação de pintos de 1 dia. Esse modelo, ou rede, alcançou um índice superior a 80% de acerto em suas classificações quanto à patogenicidade das amostras bacterianas estudadas. Esta metodologia possibilitou reduzir o uso de testes *in vivo*, quando se desejar conhecer o Índice de patogenicidade das amostras de *E. coli*, oriundas de frangos de corte.

Ao finalizar esta revisão, apesar das inúmeras pesquisas realizadas na tentativa de estabelecer os fatores determinantes de virulência de *E.coli*, infelizmente, a prova definitiva da patogenicidade das amostras ainda é realizada com o sacrifício de animais. Fica ainda a observação de que os diferentes autores propõem distintos critérios de interpretação de resultados, embora a metodologia básica dos experimentos seja a mesma, baseada em DHO & LAFONT, (1982).

Ainda existe o agravante que se visualizarmos o conjunto da literatura existente sobre o assunto, que cita trabalhos que adotam outras metodologias, fica muito difícil o estudo da patogenicidade de amostras de *E. coli* empregando como referência os trabalhos citados internacionalmente. Com esse trabalho alcançaremos o objetivo: o desenvolvimento de um método no qual seja avaliada a letalidade da amostra associada à capacidade desta mesma amostra de produzir lesões características da enfermidade e expressar o resultado em números. Tal medida diminuirá a interferência subjetiva do pesquisador e proporcionará que dois conjuntos de amostras, classificadas por este novo método, tenham suas patogenicidades médias comparadas através de critérios objetivos e com validade estatística comprovada.

Além de que pretendemos como passo seguinte, a formação de um banco de dados gerado a partir desse primeiro experimento, utilizar Redes Neurais Artificiais para construir modelos que simulem esse mesmo teste de patogenicidade sem a necessidade do uso de animais, adotando como informações de entrada alguns dos principais fatores de virulência associados a amostras patogênicas de *E.coli* pesquisados nessas amostras.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas 290 amostras de *E.coli* isoladas e identificadas bioquimicamente no CDPA/Garibaldi/RS que encontram-se congeladas a -20°C em caldo (BHI) acrescido de glicerol . Essas amostras foram isoladas em 60 propriedades diferentes, integrantes de três empresas avícolas do Rio Grande do Sul. Sendo 72 de cama de aviário coletadas no lote , às 3 semanas de idade, 159 de lesões compatíveis com celulite e 59 isoladas de quadros respiratórios.

3.2 Teste in vivo

Para cada amostra bacteriana testada, foram utilizados 10 pintos de 1(um) dia, nos quais foi inoculado, via subcutânea, 0,1mL de caldo BHI contendo 1×10^8 UFC/mL. O controle negativo constitui-se de 10 pintos de 1(um) dia, inoculados com 0,1 mL de caldo BHI estéril.

Durante 7 dias após a inoculação, foi observada a taxa de letalidade e o dia da morte desses animais, que serão, então, necropsiados para verificação de lesões características de colisepticemia: pericardite, perihepatite, aerossaculite e peritonite. No sétimo dia, os animais remanescentes serão sacrificados e submetidos aos mesmos procedimentos de necropsia já citados.

3.3 Estabelecimento de critérios para a determinação de índice de patogenicidade (IP)

Além dos critérios já citados, o tempo de morte foi utilizado para a determinação de um índice de patogenicidade, embora tenha recebido um tratamento diferente em relação a outros trabalhos. Em princípio, animais mortos nas primeiras 24 h e com isolamento de *E.coli* positivo recebiam a pontuação 1 para todos os itens observados

totalizando 10 que representa o índice máximo. Cada dia posterior às 24 h da inoculação, ou seja, do segundo ao sétimo dia, havia uma diminuição proporcional da pontuação, e a correção foi calculada da seguinte forma: dividindo o fator 1 por 7, obteve-se o número (0,14) e esse número foi subtraído de 1 a cada dia que o animal sobrevivia. Esta constante (0,14) recebeu a denominação de *Fator de Bonificação de Sobrevivência* (FBS). As demais variáveis não sofreram qualquer alteração.

O valor obtido para o tempo de morte era multiplicado por 5, para dar um peso cinco vezes maior à mortalidade em comparação com as outras lesões estudadas. Desta forma, o Índice de Patogenicidade Individual calculado nesta dissertação obedeceu à seguinte fórmula:

$$\mathbf{IPI = (TM \times 5) + P + Pe + Ph + A + C}$$

onde:

IPI = Índice de patogenicidade individual

TM = Tempo de Morte

P = Pericardite

Pe = Peritonite

Ph = Perihepatite

A = Aerossaculite

C = Celulite

Para o cálculo do Índice de Patogenicidade da amostra inoculada em 10 pintos, os valores obtidos na fórmula anterior eram divididos por 10, obedecendo a seguinte fórmula:

$$\mathbf{IP = \frac{\Sigma(IPI_{ni})}{N}}$$

N

N = nº de pintos inoculados

Tabela 1 – A tabela 1, sintetiza o comportamento de uma amostra de *E. coli*, quando foi submetida à metodologia proposta nesta dissertação.

| Amostra | Animal | Dia Morte | TM | A | P | Ph | Pe | C | IP |
|---------|--------|-----------|-------|----|----|----|----|------|------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1* | 1* | 1* | 1* | 0* | 10 |
| 1 | 2 | 2 | 0,857 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 7,29 |
| 1 | 3 | 2 | 0,857 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 9,29 |
| 1 | 4 | 3 | 0,714 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 8,57 |
| 1 | 5 | 4 | 0,571 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 6,86 |
| 1 | 6 | 4 | 0,571 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,86 |
| 1 | 7 | S** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 8 | S | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 1 | 9 | S | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 1 | 10 | S | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| IP | | | | | | | | 4,79 | |

* Ocorrência de lesão = 1

* Ausência de Lesão = 0

** S = Sacrificados no 7º dia pós-inoculação

OBS1: A coluna TN foi multiplicada por 5 para o cálculo do IP

OBS2: O cálculo do IPI é realizado com os valores das linhas e do IP é calculado com os valores das colunas

No caso de morte no primeiro dia por septicemia, todas as outras lesões eram consideradas positivas, sendo aferido o valor 10 ao IPI e, nestes casos, não foi necessário a aplicação da fórmula.

3.4 Investigação de genes associados a virulência

Os dados relativos a presença de sete genes de virulência; fimbria (*P*) e (*F11*), produção de colicina (*cvaC*), presença de aerobactina (*iut*), resistência sérica (*iss*), hemaglutinina termosensível (*tsh*), presença de antígenos capsulares (*kpsII*), além de motilidade verificada in vitro, foram obtidos por um experimento anterior utilizando as mesmas amostras por (Rocha,2006).

3.5 Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo programa computacional Sigmastat® for windows, version 2.03

3.6 Redes Neurais Artificiais

Esses resultados alimentaram uma RNA que fez predições sobre as lesões compatíveis com colibacilose geradas no teste de patogenicidade in vivo das cepas, utilizando o software Neuroshell (Ward Systems Group, Inc., Frederick,)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados obtidos através do Índice de patogenicidade

Esse trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia para a classificação da *E.coli* de diversas origens, considerando algumas outras variáveis que, freqüentemente, são normalmente consideradas de pouca relevância, para determinar a patogenicidade das cepas.

A partir do experimento realizado neste trabalho foi possível observar que, além de classificar essas bactérias como patogênicas e apatogênicas, é possível mensurar a intensidade da patogenicidade das mesmas. Constatou-se que o critério que utiliza apenas a letalidade de pintos de um dia, durante um período determinado de tempo, é questionável, tendo em vista que amostras consideradas iguais, em termos de patogenicidade medida por métodos convencionais, podem apresentar resultados totalmente diversos, se analisados o tempo de morte e a capacidade da bactéria de causar lesões compatíveis com septicemia.

O tempo decorrido entre a inoculação e a morte das aves já foi uma variável considerada por Jeffrey *et al.*, (1999), enquanto outros preferiram medir a intensidade das lesões através de análise macro e microscópica. No modelo de índice de patogenicidade proposto, foi levado em conta o tempo de morte, como a principal variável a ser contabilizada. Para melhor representar o quadro observado após as inoculações, foi criado o FBS do animal. Desta forma, quanto mais longa a sobrevivência, menor seria o valor atribuído à variável “tempo” no cálculo do índice de patogenicidade.

A septicemia seguida de morte esteve presente nas amostras consideradas patogênicas e, muitas vezes, acompanhada de lesões de celulite. Este fato, também foi observado por Jeffrey *et al.*, (1999). Por outro lado, tal achado colide com a descrição de Johnson *et al.*, (2001), que encontraram septicemia e toxemia em todos os grupos de diferentes idades trabalhados, embora só tenham observado lesão de celulite em animais com mais de 10 dias de idade. Devido ao grande número de amostras utilizadas no presente experimento, só foi possível inserir o tipo de lesão em relação à ausência ou

presença, sem considerar a intensidade das mesmas. Muitos dos critérios que pretendem medir a intensidade das lesões observadas por alguns autores são diversificados, imprecisos e de natureza muito subjetiva.

No experimento atual, foram observadas lesões compatíveis com celulite nas primeiras 6 horas pós-inoculação, confirmadas histopatologicamente. Este achado coincide com as observações feitas por Jeffrey *et al.*, (1999) e discorda de outros autores que citam o surgimento deste tipo de lesão somente após 18 horas decorrentes da inoculação bacteriana em animais mais velhos (Gomis^b *et al.*, 1997; Norton *et al.*, 1997).

A Figura 1 apresenta a distribuição do total de amostras classificadas no experimento quanto ao índice de patogenicidade, sem levar em consideração a origem das amostras. É possível perceber que há uma distribuição relativamente homogênea com predominância das amostras apatogênicas ou de baixa patogenicidade, com índices de patogenicidade 0 e 1.

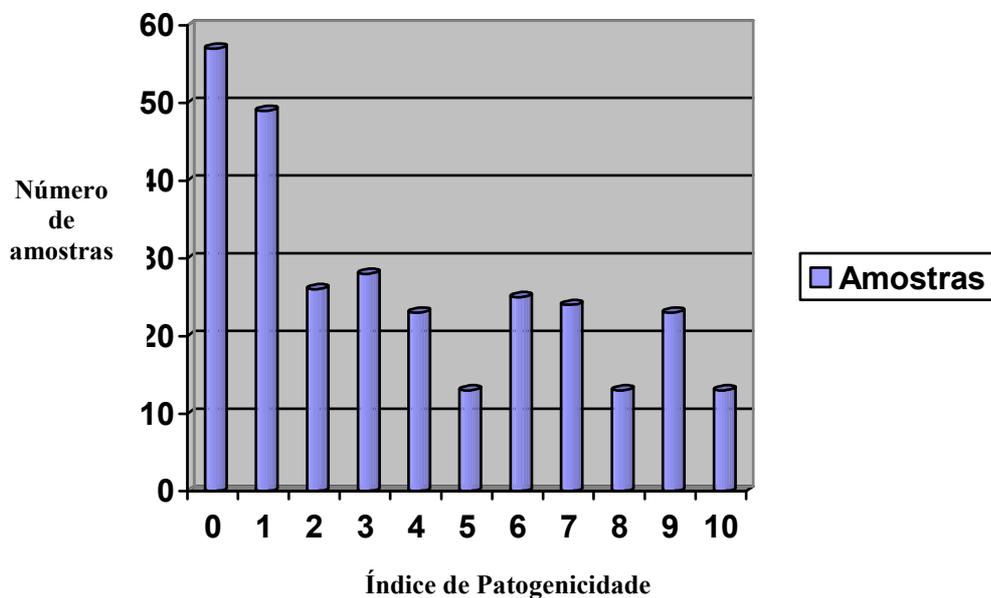


Figura 1 – Distribuição das amostras de *Escherichia coli* conforme o grupo do Índice de Patogenicidade e desconsiderando a origem das amostras.

A distribuição das amostras de acordo com a estação do ano e a origem dos isolamentos está exibida na Tabela 2. Percebe-se que as amostras com baixa patogenicidade (0 e 1) foram isoladas de diferentes quadros lesionais, ou seja, tanto de lesões cutâneas como de problemas respiratórios. Assim sendo, é provável que, no campo, estas amostras estivessem associadas a outros fatores que provocaram no animal as condições favoráveis para a proliferação bacteriana e ao desenvolvimento das lesões. No caso das amostras isoladas nas camas e com alta patogenicidade, a literatura relata um percentual de *E. coli* patogênicas (10-15%) em equilíbrio com cepas de baixa patogenicidade, ou apatogênicas (Harry & Hemsley, 1965)

Retirada do tecido subcutâneo com exposição da musculatura peitoral Figura 2 e abertura da cavidade celomática em uma ave sadia Figura 3



Figura 2 – Exposição da musculatura peitoral de uma ave sadia



Figura 3 – Abertura da cavidade celomática de uma ave sadia

Retirada do tecido subcutâneo com exposição da musculatura peitoral com lesão de celulite Figura 4 e abertura da cavidade celomática com lesão de perihepatite e pericardite Figura 5.



Figura 4 - exposição da musculatura peitoral com lesão de celulite



Figura 5 - abertura da cavidade celomática com lesão de perihepatite e pericardite

Tabela 2 – Distribuição das amostras de *Escherichia coli* conforme o grupo do Índice de Patogenicidade considerando a origem das amostras e a estação do ano.

| Origem / Estação | Grupo de patogenicidade | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------|----|---|---|----|---|---|----|---|----|----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Cama/Verão | 17* | 10 | 7 | 6 | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| Cama/Inverno | 6 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Lesão/Verão | 15 | 10 | 7 | 6 | 12 | 6 | 1 | 11 | 5 | 11 | 7 |
| Lesão/inverno | 7 | 10 | 5 | 6 | 1 | 2 | 4 | 3 | 1 | 3 | 3 |
| Respiratório | 5 | 8 | 3 | 4 | 7 | 2 | 8 | 6 | 6 | 7 | 2 |

* Número de amostras

A Tabela 3 confirma a aplicabilidade deste novo modelo de índice de patogenicidade, já que o esperado seria que as amostras de *E.coli* oriundas de quadros respiratórios e de lesões de celulite obtivessem um índice de patogenicidade significativamente maior do que as amostras isoladas de cama de aviário. O surpreendente foi a evidência de que os índices de patogenicidade de amostras respiratórias e do grupo de lesões cutâneas não diferissem estatisticamente, embora as primeiras apresentassem uma média superior. Os coeficientes de variação expressam a homogeneidade do índice de patogenicidade das amostras, o índice ainda destaca que os isolados de origem respiratória são os mais homogêneos, seguidas por aquelas isoladas de lesões cutâneas. Os dados ressaltam que o fato de haver um coeficiente de variação mais alto no índice de patogenicidade das amostras isoladas de camas de aviário pode ser atribuído à presença de uma maior diversidade de tipos de *E.coli*, incluindo-se, neste caso, algumas amostras muito patogênicas.

Tabela 3 – Média dos Índices de Patogenicidade de *Escherichia coli*, conforme a origem das amostras

| Origem da amostra | Número de amostras | Índice de Patogenicidade * | Coefficiente de Variação |
|-------------------|--------------------|----------------------------|--------------------------|
| Respiratória | 58 | 5,420±2,991 ^a | 55,16 |
| Lesão cutânea | 170 | 4,622±3,245 ^a | 70,21 |
| Cama | 72 | 2,319±2,292 ^b | 98,83 |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

* Média ± desvio padrão

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa (P≤0,001)

A estação do ano em que houve a coleta das amostras, quando analisado sem considerar a origem das mesmas, não influenciou significativamente nos índices de patogenicidade (Tabela 4). Entretanto, ao comparar os índices de patogenicidade conforme origem das amostras e a estação do ano (Tabela 5), observa-se uma esperada igualdade estatística entre os índices de patogenicidade das amostras isoladas na cama, independentemente da estação. As amostras isoladas das lesões cutâneas no inverno, tampouco foram diferentes das isoladas nas camas. Por outro lado, ficou clara a diferença significativa entre os índices de patogenicidade obtidos nas lesões cutâneas e nas de origem respiratórias, quando comparadas com as *E. coli* das camas dos aviários.

Tabela 4 – Índice de Patogenicidade de *E. coli* isoladas de lesões cutâneas e de camas em duas estações do ano.

| Estação do ano | Nº. amostras | Índice de Patogenicidade (*) | Coefficiente de Variação (%) |
|----------------|--------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Verão | 147 | 4,201±3,278 ^a | 78 |
| Inverno | 58 | 3,580±3,175 ^a | 89 |

* Média ± desvio padrão

Letras iguais representam diferença não significativa (P=0,258)

Tabela 5 – Índice de Patogenicidade de acordo com a estação do ano e da origem do isolamento da *Escherichia coli*

| Estação/Origem | Nº de amostras | Índice de Patogenicidade* | Coefficiente de Variação (%) |
|----------------|-------------------|------------------------------|------------------------------|
| Verão/ Cama | 48 | 1,785 ^a | 101 |
| Verão/ Lesão | 99 | 4,985 ^b | 64 |
| Inverno/ Cama | 13 | 1,171 ^a | 127 |
| Inverno/ Lesão | 45 | 3,142 ^{a, b} | 80 |
| Respiratórias | 58 | 5,928 ^b | 55 |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa (P≤0,05).

* Mediana

O novo método proposto para classificação do índice de patogenicidade (Tabela 6) pode ser utilizado para se ajustar as quatro diferentes categorias conforme foi utilizado no trabalho de Brito *et al.*,(2003). Verifica-se que ao agrupar os novos índices eles exibem uma vantagem imediata, ou seja, por serem expressados numericamente, é possível estabelecer diferenças significativas entre as categorias. Esta caracterização estatística, fica dificultada quando a classificação restringe-se a critério meramente qualificativo (Alta, Intermediária, Baixa e Apatogênica). Esta vantagem pode ser bem explorada ao serem comparadas as amostras de *E. coli* isoladas em uma mesma granja avícola, pois no experimento que dão base a esta tese foi demonstrado que existem distintas amostras bacterianas com patogenicidade variável e que as diferenças no índice de patogenicidade porventura existentes entre granjas de uma mesma integração, poderão ser estatisticamente caracterizadas

Tabela 6 – Agrupamento de patogenicidade (Brito,2003) versus Índice de Patogenicidade, desconsiderando a origem das amostras.

| Grupo (Brito,2003) | Nº amostras | Índice Pat. (Mediana) | 25% | 75% |
|-----------------------|-------------|--------------------------|-------|-------|
| A | 97 | 8,159 ^a | 7,142 | 9,453 |
| I | 59 | 4,571 ^b | 3,778 | 5,582 |
| B | 103 | 1,685 ^c | 1,064 | 2,300 |
| AP | 41 | 0,300 ^d | 0,100 | 0,600 |

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,001$).

A= Alta patogenicidade

I= Intermediária

B= Baixa patogenicidade

AP= Apatogênica

A Tabela 7 exemplifica o afirmado anteriormente e os resultados permitem inferir que a caracterização segura das diferenças entre os índices de patogenicidade serão levadas em conta pelos médicos veterinários no campo para sua atividade clínica.

Tabela 7 – Índices de patogenicidade de amostras de *E. coli* presentes em três diferentes granjas de uma integração avícola

| Granja | Nº de amostras | Índice de Patogenicidade |
|--------|----------------|--------------------------|
| A | 5 | 7,54 ± 4,18 ^a |
| B | 5 | 8,52 ± 3,32 ^a |
| C | 6 | 2,14 ± 2,51 ^b |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,05$)

O conceito de dia de morte apresentado na Tabela 8 poderia servir como um parâmetro para se medir o quanto a bactéria possui de manifestação aguda e septicêmica. O que parece evidente é que as amostras respiratórias apresentam maior índice de dia de morte, refletindo, assim, o comportamento “agressivo” destas amostras no campo.

Tabela 8 – Dia de morte dos animais de acordo com a estação do ano e da origem do isolamento da *Escherichia coli*

| Estação/Origem | Nº de amostras | Índice Dia da Morte* (mediana) | Coefficiente de Variação (%) |
|----------------|----------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Verão/ Cama | 48 | 2,0 ^a | 108 |
| Verão/ Lesão | 99 | 6,0 ^b | 62 |
| Inverno/ Cama | 13 | 2,0 ^a | 121 |
| Inverno/ Lesão | 45 | 4,0 ^{a, b} | 79 |
| Respiratórias | 58 | 7,5 ^c | 45 |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,05$).

* Valores com amplitude de 0 a 10 e computando o FBS.

4.2 Perfil de distribuição de lesões obtidas no teste in vivo

A Tabela 9 mostra como lesão mais prevalente a celulite, quando comparada a todas as outras lesões. A mesma tabela também revela que há uma grande variação no aparecimento das lesões, pois os Índices de dispersão das medianas têm valores altos.

Tabela 9 – Comparação entre as lesões apresentadas no traçado do Índice de Patogenicidade, desconsiderando a fonte da amostra.

| Lesões | Amostras | Presença da lesão | 25,00% | 75,00% |
|---------------|----------|-------------------|--------|--------|
| Aerossaculite | 290 | 3,00 ^a | 1,00 | 7,00 |
| Peritonite | 290 | 3,00 ^a | 1,00 | 6,00 |
| Periepatite | 290 | 3,00 ^a | 1,00 | 7,00 |
| Pericardite | 290 | 4,00 ^a | 1,00 | 7,00 |
| Celulite | 290 | 6,00 ^b | 3,00 | 8,00 |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,05$).

* Mediana

As Tabelas numeradas de 10, 11, 12 e 13 exibem a presença das distintas lesões observadas por ocasião das inoculações para o traçado da patogenicidade. Nestes casos, a mediana representa o número de animais que apresentaram a lesão, num grupo de 10 aves inoculadas. No conjunto, é imediatamente observado que os isolamentos bacterianos nas camas, quase sempre, estão acompanhadas de um coeficiente de variação mais alto do que as demais amostras e a situação se inverte, no caso das amostras de origem respiratória.

Como era de se esperar, as lesões de aerossaculite são mais freqüentes nas amostras isoladas de animais com problemas respiratórios, embora as diferenças entre as amostras de lesões cutâneas e as de respiratórias não tenham sido significativas. Os altos coeficientes de variação sugerem que a heterogeneidade das observações pode levar a resultados estatisticamente não significativos, contrariando a expectativa científica. Observe-se que as amostras de origem respiratória têm o menor coeficiente de variação, mais uma vez (Tabela, 10).

Tabela 10 – Presença de aerossaculite induzida pelas amostras de *E. coli* de acordo com a origem do isolamento.

| Origem | Nº Amostra | Aerossaculite* | Coeficiente de variação (%) |
|--------------|------------|-------------------|-----------------------------|
| Cama | 78 | 1,00 ^a | 99,00 |
| Lesão | 175 | 4,00 ^b | 83,00 |
| Respiratório | 62 | 5,00 ^b | 62,00 |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,05$).

*Mediana

As Tabelas 11, 12 e 13 relacionam os resultados referentes à peritonite, perihepatite e pericardite, lesões que, em geral estão presentes em quadros respiratórios onde há o envolvimento da *E. coli*. Analisadas em bloco, pode-se reafirmar os argumentos sugeridos anteriormente para a aerossaculite, agora referindo-se à peritonite, perihepatite e pericardite, respectivamente.

Tabela 11 – Presença de peritonite induzida pelas amostras de *E. coli* de acordo com a origem do isolamento.

| Origem | Nº Amostra | Peritonite* | Coefficiente de variação (%) |
|--------------|------------|-------------------|------------------------------|
| Cama | 78 | 1,00 ^a | 115 |
| Lesão | 175 | 4,00 ^b | 89 |
| Respiratório | 62 | 4,00 ^b | 84 |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,05$).

*Mediana

Tabela 12 – Presença de periepatite induzida pelas amostras de *E. coli* de acordo com a origem do isolamento.

| Origem | Nº Amostra | Periepatite* | Coefficiente de variação (%) |
|--------------|------------|-------------------|------------------------------|
| Cama | 78 | 1,00 ^a | 129 |
| Lesão | 175 | 4,00 ^b | 96 |
| Respiratório | 62 | 5,00 ^c | 52 |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,05$).

*Mediana

Tabela 13 – Presença de pericardite induzida pelas amostras de *E. coli* de acordo com a origem do isolamento.

| Origem | Nº Amostra | Pericardite* | Coefficiente de variação (%) |
|--------------|------------|-------------------|------------------------------|
| Cama | 78 | 1,00 ^a | 105 |
| Lesão | 175 | 5,00 ^b | 99 |
| Respiratório | 62 | 6,00 ^b | 71 |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,05$).

*Mediana

No caso da Tabela 14, apresentada a seguir, houve diferença significativa para a presença da celulite entre amostras provenientes de cama, quadros respiratórios e de lesões cutâneas. A literatura consultada já relatou a expectativa do maior aparecimento das lesões de celulite em relação a outras origens, embora tenha havido diferença entre amostras de quadros respiratórios e cama de aviários, o que não é consenso na literatura (Peighambari^a *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2001). Devemos lembrar que amostras que

matassem os animais ao primeiro dia, eram computadas como se ocorressem todas as lesões o que pode ter levado a esse resultado.

Tabela 14 – Presença de celulite induzida pelas amostras de *E. coli* de acordo com a origem do isolamento

| Origem | Nº Amostra | Celulite* | Coefficiente de variação (%) |
|--------------|------------|-------------------|------------------------------|
| Cama | 78 | 3,00 ^a | 76 |
| Lesão | 175 | 7,00 ^b | 66 |
| Respiratório | 62 | 6,00 ^c | 83 |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,05$).

* Mediana

Foi observada celulite neste experimento, nas primeiras 6 horas p.i. Este achado, acompanhado da observação de celulite no período de 7 dias p.i. de observação, reveste-se de importância quando comparado com as citações da literatura que, geralmente, utiliza animais mais velhos do que os usados neste experimento para caracterizar o aparecimento da lesão. Foi observado nesse experimento, que pintos de 1 dia podem vir a desenvolver, além da lesão de celulite, uma forma septicêmica da colibacilose, ainda mais comum, onde são observadas lesões de aerossaculite, peritonite, perihepatite e pericardite. Esse achado vem ao encontro às observações de (Peighambari^a *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2001), e contraria o relatado por (Norton *et al.*, 2000). Estes últimos, ao inocularem amostras de celulite em animais nos primeiros dias de idade, observaram septicemia e morte, levando-os a afirmar que animais jovens não desenvolvem celulite.

4.3 Uso de Redes Neurais artificiais na compreensão dos testes in vivo

A primeira rede utilizou como entrada os 7 fatores de virulência pesquisados: produção de aerobactina e colicina, antígenos capsulares K1 e K5, hemaglutinina termo-sensível, soro-resistência, fimbria P e F11 (através da biologia molecular) e motilidade (através da microbiologia convencional), além da origem do isolamento da amostra.

O resultado a ser predito é a ocorrência de aerossaculite, dividida em cinco possíveis categorias. A primeira rede construída foi capaz de classificar corretamente

62,41% das 290 amostras analisadas. A tabela 15, discrimina por categoria, como a rede se comportou ao classificar essas amostras, além da especificidade e sensibilidade da rede obtidos em cada categoria.

A rede que classifica em cinco categorias só foi usada em um primeiro momento, tendo em vista que os valores de predição foram considerados muito baixos no critério dos autores. Todas as simulações foram inicialmente feitas utilizando 2, 3, 4 e 5 categorias, porém resolvemos apresentar as redes com saídas divididas em 3 categorias, já que, além de apresentar bons valores de predição (acima de 80,00%), discrimina melhor a saída do que uma rede com somente duas categorias.

Um comportamento padrão foi observado nessas redes classificatórias, uma vez que redes com mais categorias erram mais, pois são exigidos resultados mais precisos em suas predições. As categorias localizadas nos extremos da tabela (nesse caso 1 e 5) possuem os melhores resultados, o que pode ser observado através de sua sensibilidade e especificidade, o que também foi observado por (ROCHA,2006) ao classificar através de RNA a patogenicidade de amostras de *E.coli*. Assim como a inteligência humana, as redes têm mais facilidade em perceber extremos e, quanto mais refinados forem os conceitos de classificação exigidos, mais freqüente é o erro.

Tabela 15. Classificação quanto ao número de lesões de aerossaculite, formadas durante os testes de patogenicidade, foram utilizadas como entradas os Fatores de virulência pesquisados nesse trabalho e a origem da amostra.

| Classificação | Predição | | | | | Total |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
| | Classe 1 | Classe 2 | Classe 3 | Classe 4 | Classe 5 | |
| Classe 1 | 116* | 28 | 20 | 12 | 4 | 180 |
| Classe 2 | 1 | 12* | 2 | 1 | 2 | 18 |
| Classe 3 | 2 | 0 | 11* | 4 | 0 | 17 |
| Classe 4 | 3 | 3 | 5 | 17* | 5 | 33 |
| Classe 5 | 2 | 4 | 5 | 6 | 25* | 42 |
| Total (N) | 124 | 47 | 43 | 40 | 36 | 290 |
| Sensibilidade (%) | 93,55% | 25,53% | 25,58% | 42,50% | 69,44% | |
| Especificidade(%) | 61,45% | 97,53% | 97,57% | 93,60% | 93,31% | |

N número de amostras

* Predições corretas

O anexo 5 mostra os resultados gerais de predição obtidos de redes que utilizaram como saída os fatores de virulência além da origem. Origem essa que se mostrou fundamental na melhoria dos modelos gerados para que fossem inicialmente trabalhados. Essa observação poderia ser atribuída ao fato de que amostras de origem ditas patogênicas pertencem a grupos clonais bem mais limitados que amostras de *E.coli* isoladas de ambiente ou flora microbiana de aves saudáveis. (VANDERHOOCK,2005;MCPEACKE,2005).

A tabela 16 apresenta uma equação semelhante ao modelo anterior, para prever lesões de periepatite utilizando dessa vez 3 categorias de classificação. O que pode ser notado tanto nesse modelo quanto em seus similares, vide (anexo 2), é a melhora dos resultados em relação ao modelo anterior na tabela 15, principalmente na categoria 2, dita intermediária, a que mais apresentou erros.

Tabela 16, classificação quanto ao número de lesões de periepatite, formadas durante os testes de patogenicidade, foram utilizadas como entradas os Fatores de virulência pesquisados nesse trabalho e a origem da amostra.

| Classificação | Predição | | | Total |
|--------------------|----------|----------|----------|-------|
| | Classe 1 | Classe 2 | Classe 3 | |
| Classe 1 | 140* | 26 | 10 | 176 |
| Classe 2 | 10 | 36* | 9 | 55 |
| Classe 3 | 6 | 15 | 38* | 59 |
| Total (N) | 156 | 77 | 57 | 290 |
| Sensibilidade (%) | 89,74% | 46,75% | 66,67% | |
| Especificidade (%) | 73,13% | 91,08% | 90,99% | |

N número de amostras

* Predições corretas

A tabela 17, representando o terceiro modelo, somente difere do modelo expresso na tabela 16 pela adição de uma terceira entrada (o IP), obtido em testes in vivo e utilizando pintos de 1 dia (previamente descrito nessa tese). Essa informação

permitiu a obtenção de um índice de acerto geral de 90,34% o mais alto encontrado neste trabalho, embora esse mesmo índice tenha em sua formulação dados relativos ao número de lesões obtidas. Não deve ser considerado uma entrada óbvia, pois o índice, por possuir outras informações adicionais, se transforma em uma tendência da bactéria em causar dano ao animal. Além do que qualquer tipo e quantidade de lesão ou tempo de morte desses animais pode gerar um índice de mesmo valor.

Os valores referentes a esses modelos, de maneira geral, alcançaram números próximos de 85,00%, conforme pode ser visto no anexo 3. Aqui fica em aberto a possibilidade de ao invés de se fazer o teste *in vivo* usar as Redes Neurais estabelecidas por (ROCHA,2006), que são capazes de determinar o IP através as mesma informações obtidas . Um achado constante nesses testes *in vivo* (como mostram os anexos 1,2 e 3) é a maior dificuldade das redes em prever o número de lesões de celulite formadas em comparação com as demais lesões.

Tabela 17. Validação de uma RNA classificatória quanto ao número de lesões de periepatite, formadas durante os testes de patogenicidade e as entradas fatores de virulência e a origem da amostra.

| Classificação | Predição | | | Total |
|----------------|----------|----------|----------|-------|
| | Classe 1 | Classe 2 | Classe 3 | |
| Classe 1 | 160* | 16 | 1 | 177 |
| Classe 2 | 1 | 51* | 2 | 54 |
| Classe 3 | 1 | 7 | 51* | 59 |
| Total (N) | 162 | 74 | 54 | 290 |
| Sensibilidade | 98,77% | 68,92% | 94,44% | |
| Especificidade | 86,72% | 98,61% | 96,61% | |

N número de amostras

* Predições corretas

Na, tabela 18 foi proposto um modelo que utiliza como entrada, além dos fatores de virulência e da origem já citados, o uso do número de lesões de celulite formadas durante o teste de inoculação denominando “Cel(N)”. Partindo do princípio que lesões de celulite induzidas experimentalmente surgem em menos de 24 hs (JEFFREY,1999), e que há uma melhora em relação ao modelo proposto, no anexo 2 possibilitaria a execução de um teste *in vivo* alternativo com somente um dia de duração e apresentaria melhora em relação a um modelo gerado no anexo 2. Porém os resultados obtidos, se comparados às redes obtidas usando FV+ORI+ IP, se mostram inferiores.

Tabela.18- Classificação quanto ao número de lesões observadas no experimento, formadas durante os testes de patogenicidade, foram utilizadas como entradas os Fatores de virulência pesquisados nesse trabalho e a origem da amostra.

| Categoria de lesão | Aerossaculite | Pericardite | Peritonite | Periepatite |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Classificação Correta | 229 (78,97%) | 233 (80,34%) | 227 (78,28%) | 238 (82,07%) |
| Classificação Incorreta | 61 (21,03%) | 57 (19,66%) | 53 (21,72%) | 52 (17,93%) |

A tabela 19, foi uma rede criada para determinar a possibilidade de definir a origem de uma amostra por suas propriedades de virulência, onde a rede foi capaz de acertar 67,24% os resultados, embora exista na literatura larga documentação a respeito de genes relacionados a um determinado tipo de isolado. As redes não conseguem explicar essa relação de forma precisa, devido ao fato de que ,na verdade, um gene isolado não faz essa amostra patogênica ou não ,sendo a interação entre esses o que realmente determina essa condição (KHUNERT,2000) e gerando ,assim, diversas combinações possíveis .

Tabela.19- Classificação da origem dos isolados a partir dos fatores de virulência

| Classificação | Predição | | | Total |
|----------------|----------|----------|--------------|-------|
| | Cama | Celulite | Respiratório | |
| Cama | 32* | 17 | 6 | 55 |
| Celulite | 38 | 138* | 28 | 204 |
| Resp. | 2 | 4 | 25* | 31 |
| Total | 72 | 159 | 59 | 290 |
| Sensibilidade | 44,44% | 86,79% | 42,37% | |
| Especificidade | 89,45% | 49,62% | 97,40% | |

N número de amostras

* Predições corretas

Ao agruparmos amostras de origem em celulite e quadros respiratórios, partindo do princípio de que, se estão reunidas por serem patogênicas, apresentam fatores de virulência em comum (Delicato, 2003; Rocha, 2006), ocorre uma melhora significativa na capacidade de predição geral das redes 77,93% , como mostra a tabela 20. Porém devemos considerar que a especificidade e sensibilidade por categoria patogênica e apatogênica permanecem semelhantes às apresentadas na Tabela 19, indicando que a rede só melhorou a sua capacidade de acerto pelo agrupamento de duas categorias.

O anexo 4 é composto de algumas tentativas de melhorar a predição da saída origem, através de outras entradas usadas em modelos anteriores e que, nesse caso, de pouco serviram. O que nos permite concluir que a origem é uma valiosa entrada para construção de modelos, pois melhora significativamente a capacidade de predição das redes, porém como saída ,além de ser difícil de ser compreendida , é pouco prática em termos de utilização a campo.

Tabela.20- Classificação da patogenicidade dos isolados a partir dos fatores de virulência

| Classificação | Predição | | Total |
|----------------|--------------|-------------|-------|
| | Apatogênicas | Patogênicas | |
| Origem | | | |
| Apatogênicas | 31* | 23 | 54 |
| Patogênicas | 41 | 195* | 236 |
| Total (N) | 72 | 218 | 290 |
| Sensibilidade | 43,06% | 89,45% | |
| Especificidade | 89,45% | 43,06% | |

N número de amostras

* Predições corretas

As amostras selecionadas na tabela 21 possuem todos os fatores de virulência pesquisados. O que se pode observar é que nenhuma das amostras selecionadas atingiu o índice de patogenicidade máximo “10”. Primeiramente, devido ao fato de que ter muitos genes não significa que todos serão expressados, já que, muitas vezes, fatores de virulência detectados por técnicas de biologia molecular não são expressados in vitro (Gomis,2001)

Outra observação interessante é que a amostra 5 possui alto índice de patogenicidade e foi isolada na cama, o que nos remete a pensar que a *E.coli* ambiental, em condições adequadas, possui plenas condições de causar danos ao hospedeiro. (YAGUCHI et al, 2007). Além de que amostras residentes na cama podem servir de “banco” , não só de fatores de virulência, como também de resistência a antimicrobianos.

Tabela 21 - Amostras selecionadas com todos os Fv e Motilidade

| Amostra | Origem | Aero. | Perit | Perie. | Peric. | Cel. | (I P) |
|---------|--------|-------|-------|--------|--------|------|-------|
| 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,30 |
| 2 | 1 | 3 | 2 | 3 | 2 | 6 | 3,10 |
| 3 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1,21 |
| 4 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 1,20 |
| 5 | 0 | 6 | 5 | 6 | 6 | 9 | 7,13 |
| 6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 2,13 |
| 7 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0,66 |
| 8 | 2 | 5 | 2 | 3 | 5 | 3 | 4,80 |
| 9 | 2 | 4 | 3 | 4 | 1 | 2 | 2,97 |

Origem Cama 0; Celulite 1 e Respiratório 2
IP Índice de patogenicidade

Uma das características mais positivas desse experimento é o número de amostras trabalhadas: 299. Esse número de amostras tem como objetivo servir de alicerce para se observar padrões de virulência diversos, o que antes seria dificultado em razão da maioria dos experimentos trabalharem com um limitado número de amostras. Vale ainda lembrar que, há algum tempo atrás, geralmente identificavam-se amostras patogênicas através dos sorogrupos mais prevalentes em lesões.

Este trabalho pretende abrir a possibilidade de associar esses índices de patogenicidade com seu comportamento no campo e estabelecer qual o impacto de uma amostra com um determinado índice de patogenicidade na produção avícola. Isto posto, haveria a possibilidade de se coletar amostras no campo da cama e microbiota dos animais e fazer previsões do quanto essa amostra prevalente no ambiente, e nos animais, pode ser determinante nas perdas econômicas daquele lote. Associado a ferramentas de inteligência artificial, a estudos para determinação de fatores de risco e a resistência a antimicrobianos, seria possível realizar previsões e simulações e, através delas, propor medidas de controle adequadas e economicamente viáveis.

CONCLUSÕES

Com o presente trabalho realizado podemos concluir que:

Com a nova metodologia proposta neste trabalho, é possível identificar diferenças estatisticamente significativas entre os índices de patogenicidade das amostras.

Cepas de *E.coli* provenientes de quadros respiratórios e de amostras de lesão de celulite, possuem índice de patogenicidade maior que amostras bacterianas oriundas de cama.

A utilização do cálculo do tempo de morte, corrigido pelo Fator de Bonificação de Sobrevivência (FBS) e da presença de cinco tipos de lesões de colibacilose, refletiu adequadamente a virulência da amostra, após a inoculação em pintinhos.

Não houve relação entre a origem da amostra de *E.coli* e a capacidade de causar alguma lesão específica em animais inoculados.

Os índices de patogenicidade, com maiores coeficientes de variação foram encontrados nas amostras oriundas das camas de aviários.

As redes neurais conseguiram de forma satisfatória predizer as lesões produzidas no teste in vivo, em geral, os resultados obtidos com as redes classificatórias estão próximos a 80% de acerto, no mínimo.

Existência de um comportamento padrão das redes quanto a saída, número de lesões e agrupamento desta mesma saída.

Tanto a presença quanto a ausência de genes e até mesmo a soma destes FV não são os únicos fatores determinante na patogenicidade observada nos testes in vivo.

Deve se considerar mais entradas além dos fatores de virulência para a obtenção de redes mais eficazes como; Origem, Índice de Patogenicidade e número de lesões de celulite formadas ao primeiro dia.

A origem do isolado pode ser aproveitada como uma boa entrada mas como saída é imprecisa e desnecessária.

REFERÊNCIAS

ABEF em www.abef.com.br, 2008.

Altekruse S. F. ; Elvinger A. F. ; DebRoy B.C. ; Pierson D. F. W.; Eifert B. J. D.: Sriranganathan E N.C: Pathogenic and Fecal Escherichia coli Strains from Turkeys in a Commercial Operation. **Avian Diseases** . v. 46 p. 562–569, 2002

ASGAV, 2007, Disponível em: <http://asgav.com.br>. Acesso em 02/11/2007

Assis, ACB and Santos, BM. Patogenicity In Vivo and In Vitro of Escherichia Coli Samples from Avian Origin. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, May/Aug. 2001, vol.3, no.2, p.181-184.

Barnes, H.J.;Groos, W.B.Diseases of Poultry.10º edição ,ed. B.W.Calnek, Iowa State University Press, Ames, Iowa USA,1997.

Beer, Joachim. Doenças infecciosas em animais domésticos.ed ?,Roca Ltda São Paulo, Brasil,1999.

Bettelheim, K.; Thomas, G. *E. coli* as Pathogens. Phenotypic characteristics. Serotypes Disponível em:URL:<http://ecoli.bham.ac.uk/> Acesso em 16 de janeiro de 2006.

Binns, M. M.; Davies, D. L.;Hardy, K. G. Cloned fragments of the Plasmid Colv,IK94 specifying virulence and serum resistance. **Nature**, v. 279, n. 5716, p. 778-781, 1979.

Binns, M. M.; Mayden, J.;Levine, R. P. Further Characterization of Complement Resistance Conferred on Escherichia-Coli by the Plasmid Genes Trt of R100 and Iss of Colv,I-K94. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 2, p. 654-659, 1982.

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

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

Brion G. M.; Srinivasa L: A Neural Network approach to Identifying Non-Point sources of microbial contamination. **Wat. Res.** Vol. 33, No. 14, pp. 3099-3106, 1999.

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

Brito, B. G. Fatores de virulência e variabilidade genética de amostras de Escherichia coli isoladas de aves com celulite.Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo,70 p.,1999

Caya, F.; Fairbrother, J. M.; Lessard, L.; Quessy, S. Characterization of the risk to human health of pathogenic Escherichia coli isolates from chicken carcasses. **J. Food Prot.** v.62, n.7, p.741-746, 1999.

Chao, K., Chen, Y.R., Hruschka, W.R. and Gwozdz, F.B. (2002). On-line inspection of poultry carcasses by dual-camera system. *Journal of Food Engineering*, 51, 185-192.

Chuba, P. J. ; Palchaudhuri, S. Outer-Membrane Proteins of Escherichia-Coli Carrying Serum Resistance Plasmid Colv,I-K94. *Plasmid*, v. 11, n. 2, p. 191-191, 1984.

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

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

Deree, J. M.; Schwillens, P.; Vandebosch, J. F. Monoclonal-Antibodies That Recognize the P-Fimbriae F71, F72, F9, and F11 from Uropathogenic Escherichia-Coli. *Infection and Immunity*, v. 50, n. 3, p. 900-904, 1985.

Derosa, M.; Ficken, M. D.; Barnes, H. J. Acute Airsacculitis in Untreated and Cyclophosphamide-Pretreated Broiler-Chickens Inoculated with Escherichia-Coli Or Escherichia-Coli Cell-Free Culture Filtrate. *Veterinary Pathology*. v.29, n.1, p.68-78, 1992.

Dho, M. ; Lafont, J. P. Adhesive Properties and Iron Uptake Ability in Escherichia-Coli Lethal and Nonlethal for Chicks. *Avian Diseases*, v. 28, n. 4, p. 1016-1025, 1984.

Dho, M.; Lafont, J. P. Escherichia-Coli Colonization of the Trachea in Poultry - Comparison of Virulent and Avirulent Strains in Gnotoxenic Chickens. *Avian Diseases*. v.26, n.4, p.787-797, 1982.

Dozois, C. M.; Dho-Moulin, M.; Bree, A.; Fairbrother, J. M.; Desautels, C.; Curtiss, R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian Escherichia coli and localization and analysis of the tsh genetic region. *Infection and Immunity*. v.68, n.7, p.4145-4154, 2000.

Dozois, C. M.; Fairbrother, J. M.; Harel, J.; Bosse, M. Pap-Related and Pil-Related Dna-Sequences and Other Virulence Determinants Associated with Escherichia-Coli Isolated from Septicemic Chickens and Turkeys. *Infection and Immunity*. v.60, n.7, p.2648-2656, 1992.

Elfadil, A. A.; Vaillancourt, J. P.; Meek, A. H. Impact of stocking density, breed, and feathering on the prevalence of abdominal skin scratches in broiler chickens. *Avian Diseases*. v.40, n.3, p.546-552, 1996.

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

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

Fallavena, L. C. B.; Moraes, H. L. S.; Salle, C. T. P.; da Silva, A. B.; Vargas, R. S.; do Nascimento, V. P.; Canal, C. W. Diagnosis of skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses - a microscopic and macroscopic study. **Avian Pathology**. v.29, n.6, p.557-562, 2000.

Ferreira, A.J.P; Knöbl, T. Colibacilose Aviária. In Berquieri, A.,M.Doença das aves. Campinas :2000;197-205.

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

Gibbs, P. S.; Petermann, S. R.;Wooley, R. E. Comparison of several challenge models for studies in avian colibacillosis. **Avian Diseases**, v. 48, n. 4, p. 751-758, 2004.

Gilson, L.; Mahanty, H. K.;Kolter, R. 4-Plasmid Genes Are Required for Colicin-V Synthesis, Export, and Immunity. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 6, p. 2466-2470, 1987.

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

Gomis, S. M.; Goodhope, R.; Kumor, L.; Caddy, N.; Riddell, C.; Potter, A. A.; Allan, B. J. Isolation of *Escherichia coli* from cellulitis and other lesions of the same bird in broilers at slaughter. **Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne**. v.38, n.3, p.159-162, 1997.

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

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

Harry, E. G.; Hemsley, L. A. Relationship Between Environmental Contamination with Septicaemia Strains of *Escherichia Coli* and Their Incidence in Chickens. **Veterinary Record**. v.77, n.9, p.241-&, 1965

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

Hoschutzky, H.; Nimmich, W.; Lottspeich, F.;Jann, K. Isolation and Characterization of the Non-Fimbrial Adhesin Nfa-4 from Uropathogenic *Escherichia-Coli* O7-K98-H6. **Microbial Pathogenesis**, v. 6, n. 5, p. 351-359, 1989.

Janßen T.;Schwartz C.; Preikchat P.; Voss M.; Philipp H-C.; Wieler L.H.; Virulence associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **Int.Journal. Med.Microbiolo** .v.291 p.371-37,2001.

- Jeffrey, J. S.; Chin, R. P.; Singer, R. S. Assessing cellulitis pathogenicity of *Escherichia coli* isolates in broiler chickens assessed by an in vivo inoculation model. **Avian Diseases**. v.43, n.3, p.491-496, 1999.
- Johnson, T. J.; Siek, K. E.; Johnson, S. J.; Nolan, L. K. DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4681-4688, 2005.
- Johnson, L. C.; Bilgili, S. F.; Hoerr, F. J.; McMurtrey, B. L.; Norton, R. A. The effects of early exposure of cellulitis-associated *Escherichia coli* in 1-day-old broiler chickens. **Avian Pathology**. v.30, n.2, p.175-178, 2001
- Johnson, L. C.; Bilgili, S. F.; Hoerr, F. J.; McMurtrey, B. L.; Norton, R. A. The influence of *Escherichia coli* strains from different sources and the age of broiler chickens on the development of cellulitis. **Avian Pathology**. v.30, n.5, p.475-478, 2001.
- Joiner, K. A.; Goldman, R. C.; Hammer, C. H.; Leive, L.; Frank, M. M. Studies of the Mechanism of Bacterial-Resistance to Complement-Mediated Killing .5. Igg and F(Ab')₂ Mediate Killing of *Escherichia-Coli* 0111B4 by the Alternative Complement Pathway Without Increasing C5B-9 Deposition. **Journal of Immunology**, v. 131, n. 5, p. 2563-2569, 1983.
- Knobl, T.; Baccaro, M. R.; Moreno, A. M.; Gomes, T. A. T.; Vieira, M. A. M.; Ferreira, C. S. A.; Ferreira, A. J. P. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. **Veterinary Microbiology**. v.83, n.1, p.71-80, 2001
- Kovács, Z. L. Redes Neurais Artificiais: Fundamentos e Aplicações: um texto básico. 2 ed. São Paulo: Edição acadêmica, 1996. 174p.
- Kumor, L. W.; Olkowski, A. A.; Gomis, S. M.; Allan, B. J. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. **Avian Dis**. v.42, n.2, p.285-291, 1998.
- Kuhnert, P.; Boerlin, P.; Frey, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **Fems Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 107-117, 2000.
- Lior, H. Classification of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans , ed. Gyles, C.L., Cab International, UK, p. 31-72, 1994.
- Luria. S.E.; Suit, J.L. Colicins and COL Plasmids *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: celular and molecular Biology. Edited by: Neidhardt, F.C., Washington, D.C., v. 2, p. 1615-1624, 1987.
- Macklin, K. S.; Norton, R. A.; McMurtrey, B. L. Scratches as a component in the pathogenesis of avian cellulitis in broiler chickens exposed to cellulitis origin *Escherichia coli* isolates collected from different regions of the US. **Avian Pathology**. v.28, n.6, p.573-578, 1999.

- Mellata, M.; Dho-Moulin, M.; Dozois, C. M.; Curtiss, R.; Brown, P. K.; Arne, P.; Bree, A.; Desautels, C.; Fairbrother, 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.
- Messier, S.; Quessy, S.; Robinson, Y.; Devriese, L. A.; Homme, J.; Fairbrother, J. M. Focal Dermatitis and Cellulitis in Broiler-Chickens - Bacteriological and Pathological Findings. **Avian Diseases**. v.37, n.3, p.839-844, 1993.
- Montgomerie, J. Z.; Bindereif, A.; Neilands, J. B.; Kalmanson, G. M.; Guze, L. B. Association of Hydroxamate Siderophore (Aerobactin) with *Escherichia-Coli* Isolated from Patients with Bacteremia. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 3, p. 835-838, 1984.
- Moura, A. C.; Irino, K.; Vidotto, M. C. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated. by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. **Avian Diseases**. v.45, n.1, p.173-181, 2001
- Nakamura, K.; Narita, M.; Imai, K.; Matsumura, T.; Maeda, M.; Tanimura, T. The effect of mixed live vaccines of Newcastle disease and infectious bronchitis on the chicken respiratory tract. **J. Comp Pathol**. v.106, n.4, p.341-350, 1992
- Naveh, M. W.; Zusman, T.; Skutelsky, E.; Ron, E. Z. Adherence Pili in Avian Strains of *Escherichia-Coli* - Effect on Pathogenicity. **Avian Diseases**, v. 28, n. 3, p. 651-661, 1984.
- Neilands, J. B.; Bindereif, A.; Montgomerie, J. Z. Genetic basis of iron assimilation in pathogenic *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**. v.118, p.179-195, 1985.
- Neilands, J. B. Iron-Absorption and Transport in Microorganisms. **Annual Review of Nutrition**, v. 1, p. 27-46, 1981.
- 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 Diseases**. v.46, n.1, p.143-152, 2002
- Nolan, L. K.; Horne, S. M.; Giddings, C. W.; Foley, S. L.; Johnson, T. J.; Lynne, A. M.; Skyberg, J. Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*. **Veterinary Research Communications**. v.27, n.2, p.101-110, 2003
- Norton, R. A.; Bilgili, S. F.; McMurtrey, B. C. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. **Avian Diseases**. v.41, n.2, p.422-428, 1997.
- Norton, R. A.; Macklin, K. S.; McMurtrey, B. L. The association of various isolates of *Escherichia coli* from the United States with induced cellulitis and colibacillosis in young broiler chickens. **Avian Pathology**. v.29, n.6, p.571-574, 2000.
- Onderka, D. K.; Hanson, J. A.; McMillan, K. R.; Allan, B. *Escherichia coli* associated cellulitis in broilers: Correlation with systemic infection and microscopic visceral lesions, and evaluation for skin trimming. **Avian Diseases**. v.41, n.4, p.935-940, 1997.

Orskov, I. ; Orskov, F. Serology of Escherichia-Coli Fimbriae. **Progress in Allergy**, v. 33, p. 80-105, 1983.

Park, B.; Chen, Y. R.; Nguyen, M.. Multispectral image analysis using neural network algorithm for inspection of poultry carcasses. **Journal of Engng. Researche**, v. 69, p.351-363, 1998.

Peighambari, S. M.; Julian, R. J.; Vaillancourt, J. P.; Gyles, C. L. Escherichia-Coli Cellulitis - Experimental Infections in Broiler-Chickens. **Avian Diseases**. v.39, n.1, p.125-134, 1995

Peighambari, S. M.; Vaillancourt, J. P.; Wilson, R. A.; Gyles, C. L. Characteristics of Escherichia-Coli Isolates from Avian Cellulitis. **Avian Diseases**. v.39, n.1, p.116-124, 1995

Pinto, P. R.. Utilização de redes neurais artificiais no gerenciamento de matadouros-frigoríficos de aves e suínos no sul do Brasil. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Pourbakhsh, S. A.; Boulianne, M.; Martineau-Doize, B.; Fairbrother, J. M. Virulence mechanisms of avian fimbriated Escherichia coli in experimentally inoculated chickens. **Veterinary Microbiology**. v.58, n.2-4, p.195-213, 1997.

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

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

Rocha, A.C.G.P (2006). Utilização de Inteligência artificial (redes neurais artificiais) para classificação de patogenicidade de amostras de Escherichia coli isoladas de frangos de corte.Tese de Doutorado, Universidade Federal of Rio Grande of Sul.

Rohrbach, M. R.; Braun, V.;Koster, W. Ferrichrome Transport in Escherichia-Coli K-12 - Altered Substrate-Specificity of Mutated Periplasmic Fhud and Interaction of Fhud with the Integral Membrane-Protein Fhub. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 24, p. 7186-7193, 1995.

Roush, W. B.; Wideman Jr., R. F. Evaluation of broiler growth velocity and acceleration in relation to pulmonary hypertension syndrome. **Poult. Sci**. v.79, n.2, p.180-191, 2000.

Roush, W.B., Cravener, T.L., Kirby, Y.K. & Wideman, R.F. (1997). Probabilistic Neural Network prediction of ascites in broilers based on minimal invasive physiological factors. **Poultry Science**, 76, 1513-1516. 2001

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

Salle, F.O., Pinto, P.R., Martins, S.S., Moraes, H.L.S., Nascimento, V.P. & Salle, C.T.P. (2006). Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento do incubatório de uma empresa avícola do sul do Brasil. In Apinco 2006 Conference of Poultry Science and Technology (p.170). Santos, Brazil.

Salle, C.T.P., Reali, E.H., Guahyba, A.S., Salle, F.O., Rocha, A.C.G.P. & Moraes, H.L.S. (2004). Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento da produção de frangos de corte. Apinco 2004 Conference of Poultry Science and Technology (p.158). Santos, Brazil.

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. Rev. Bras. Cienc. Avic., Sep./Dec. 2001, vol.3, nº. 3, p. 257-264.

Salle, C.T.P.; Cé, M. C.; Wald, V. B.; Santos, C. H. C.; Nascimento, V. P.; Canal, C. W.; Moraes, H. L. S.; Oliveira, S. D.. Estabelecimento de critérios de interpretação para resultados sorológicos de matrizes de corte através de modelos matemáticos. Brazilian Journal of Poultry Science, v.1, n.1, p.61-65, 1999.

Smith, H. W. Search for Transmissible Pathogenic Characters in Invasive Strains of *Escherichia-Coli* - Discovery of A Plasmid-Controlled Toxin and A Plasmid-Controlled Lethal Character Closely Associated, Or Identical, with Colicine-V. **Journal of General Microbiology**, v. 83, n. JUL, p. 95-111, 1974.

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

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

Tizard, I.R.; Sistema Complemento. Introdução a Imunologia Veterinária. Roca, 5 ed edição, São Paulo, Brasil, 545p., 1996.

Trampel D. W.; Wannemuehler Y.; Nolan L. K: Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Peritonitis Lesions in Commercial Laying Hens. **Avian Diseases** v.51 p. 840–844, 2007.

Vidotto, M. C.; Cacao, J. M. C.; Goes, C. R.; Santos, D. S. Plasmid Coding for Aerobactin Production and Drug-Resistance Is Involved in Virulence of *Escherichia-Coli* Avian Strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 7, p. 677-685, 1991.

Vidotto, M. C.; Muller, E. E.; Defreitas, J. C.; Alfieri, A. A.; Guimaraes, I. G.; Santos, D. S. Virulence Factors of Avian *Escherichia-Coli*. **Avian Diseases**. v.34, n.3, p.531-538, 1990.

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

Wooley, R. E.; Brown, J.; Gibbs, P. S.; Nolan, L. K.; Turner, K. R. Effect of Normal Intestinal Flora of Chickens on Colonization by Virulent Colicin V-Producing, Avirulent, and Mutant Colicin V-Producing Avian Escherichia-Coli. **Avian Diseases**, v. 38, n. 1, p. 141-145, 1994.

Yaguchi, .A.C. T.; Ogitani A R.; Osawa B M.; Kawano B N.; Kokumai A T.; Kaneshige A T.; Noro A. K.; Masubuchi A.; Shimizu Y.A.; Virulence Factors of Avian Pathogenic Escherichia coli Strains Isolated from Chickens with Colisepticemia in Japan. **Avian Diseases**. v.51,n.1 p.656-662, 2007.

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.

Anexo 1- Aceite artigo Intitulado: Estabelecimento de um modelo animal para classificação quanto a patogenia de amostras de *E.coli* de origem aviária



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Acta Scientiae Veterinariae
ISSN 1679-9216 (on line)



Fax: +55 51 3308-7305
Phone: +55 51 3308-6964
e-mail: laerte.ferreiro@ufrgs.br
http://www.ufrgs.br/actavet/

PARECER FINAL

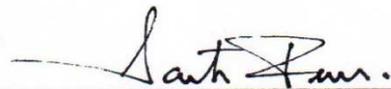
Porto Alegre, 18 de fevereiro de 2010.

Senhor(a) autor(a): **Guilherme Fonseca de Souza**, Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha, Silvio Luis da Silveira Rocha, Felipe de Oliveira Salle, Hamilton Luiz de Souza Moraes, Lucas Brunelli de Moraes & Carlos Tadeu Pippi Salle

Título do Trabalho: Estabelecimento de um modelo animal para a classificação quanto a patogenia de amostras *E. coli* de origem aviária

~ O referido trabalho obteve **parecer FAVORÁVEL** para publicação no **Volume 38**, **Número 3**, de 2010.

Atenciosamente,



Laerte Ferreiro
Editor – ASV

Anexo.2
1

Ana Cristina G. Pinto da Rocha^{2,3*}, Silvio Luis da Silveira Rocha³, Carlos André da Veiga Lima-Rosa⁴, Guilherme Fonseca de Souza³, Hamilton Luiz de Souza Moraes³, Felipe de Oliveira Salle³, Lucas Brunelli de Moraes³ and Carlos Tadeu Pippi 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(0):00-00. Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: ana.crocha@terra.com.br

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.

¹ Received on July 20, 2006.

Accepted for publication on January 25, 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 Veterinária, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-900, 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.

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 associadas 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 fundamental 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 thermal cycler PCT-100 (MJ Research) and the amplified DNA was visualized in agarose gel at 1.2% (Invitrogen Life Technologies, USA) containing ethidium bromide (Sigma, USA).

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

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

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

RESULTS AND DISCUSSION

Many researchers have 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.

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

| <i>cvaC</i> (%) | <i>iss</i> (%) | <i>iutA</i> (%) | <i>kpsII</i> (%) | <i>papC</i> (%) | <i>fel A</i> (%) | <i>tsh</i> (%) | Motilidade (%) |
|--------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| 14.0 (23.0) | 45.0 (73.8) | 28.0 (45.9) | 11.0 (18.0) | 15.0 (24.6) | 24.0 (39.3) | 34.0 (55.7) | 33.0 (54.1) |

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 *iut A* gene, which codifies outer membrane protein aerobactin receptor, was detected in 45.8% of the samples. Gomis et al. (2001) reached similar results (46.8%). Rodriguez-Siek et al. (2005) and Delicato et al. (2003) got 80.2% and 63%.

Vandekerchove et al. (2005) presented a lower result (23%). Rodriguez-Siek et al. (2005) detected higher results, 41.2%.

A serologic variant of P fimbriae (F11) is codified by the *felA* operon (De Ree et al. 1985). In samples analyzed in the present study, 39.3% were positive for the presence of this gene. Controversial results are reported by other authors, 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 appendixes, give motility to Gram positive and negative bacteria in aqueous media. Their rotating movements allow microorganisms to approach adjacent epithelial cells, crossing the mucus barrier and causing adhesion, multiplication, colonization and infection (La Ragione & Woodward 2002). In the present study motility was detected in 54.1% of the samples, higher than 36.8% reported by McPeake et al. (2005).

The diversity of 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. & Kolter 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.
- Rodriguez-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.

Anexo. 3**Developing an animal model for classification of Pathogenicity on *E.coli* of avian origin**

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

¹Centre for diagnostics and Research in Avian Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 8824, Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, 91546-000: Laboratory of Microbiological and Avian Pathology

²General Coordination of Animal Laboratories Ministry of Agriculture Livestock and Food
CORRESPONDÊNCIA: G.F. Souza [guilhermefsouza@yahoo.com.br]; FAX +55 (51) 3319-1062.

ABSTRACT

Background: *Escherichia coli* is a common bacterium in the poultry environment and in the microbiota of domestic animals. This bacterial community is usually apathogenic; however, a smaller percentage of this population is pathogenic, and pathogenesis has variable characteristics within this group. Several authors have assessed the pathogenicity of *E. coli* strains using *in vivo* tests in one-day chicks. Usually, the main parameter assessed by these tests concerns the mortality caused by each strain in a given group of animals. However, weighting all the variables (including mortality) in these experiments is not an easy task and may eventually lead to different interpretations of the results. The aim of the present study is to propose a new methodology for the classification of *Escherichia coli* pathogenicity by using an index which contemplates multiple aspects that are peculiar to a pathogenicity test based on the inoculation of one-day chicks.

Material, Methods & Results: To achieve that, 300 *E. coli* strains were obtained from flocks with cellulitis lesions, from the litter of these flocks and from flocks with respiratory symptoms, belonging to the culture collection of Institution. All strains were biochemically confirmed as *E. coli*. *E. coli* strains were incubated in a Brain Heart Infusion (BHI) broth at 37° C for 20 hours. The inoculum was prepared using this broth and its concentration was standardized as 10⁸ CFU/mL. Each *E. coli* strain was subcutaneously inoculated at 0.1 mL in a group of 10 one-day chicks, which were monitored for 7 days and kept with water and food *ad libitum* and under a controlled environment. The animals that died during the 7-day challenge were necropsied and checked for the following lesions: air sacculitis, pericarditis, peritonitis, cellulitis, and perihepatitis. The control groups were inoculated likewise, using the same route of

administration and amount of inoculum (only BHI), and were submitted to the same necropsy and observation procedures. During this period, the animals were monitored, and some parameters, chosen by the authors as most relevant for determining the pathogenicity of an *in vivo* challenge of young animals, were recorded. After the 7-day challenge, the animals were sacrificed and necropsied. These factors consisted of the number of animals that died and of the day of their death during the challenge, as well as of systemic lesions that characterize colibacillosis. The data were submitted to a mathematical model developed by the authors which includes all of the aforementioned variables. Weights were ascribed to each variable in order to establish a value between 0 and 10 for the pathogenicity index. The time elapsed between inoculation and death was recorded, and the presence of characteristic lesions of colibacillosis was checked. For improved accuracy of the time of death, we used the survival bonus factor, which subtracts 0.14 from 1 for each day elapsed between inoculation and death. At the end of the experiment, all of the remaining animals, including controls, were sacrificed in compliance with ethical and animal welfare policies.

Discussion: The pathogenicity index proposed here is an attempt to eliminate the subjective judgment used by studies alike and which utilize a similar methodology, by inferring statistical difference between strains and attributing weights to the different variables observed in an *in vivo* test. The *E. coli* strains obtained from the litter had a significantly lower pathogenicity index than those strains isolated from skin lesions and from flocks with respiratory symptoms. Also, these isolates showed different characteristics regarding the day of death index.

Keywords: *Escherichia coli*, *in vivo* test, pathogenicity.

Descritores: *Escherichia coli*, patogenicidade, teste *in vivo*

INTRODUÇÃO

Colibacilose é a denominação comum para um grupo de lesões de caráter extra-intestinal causado pela bactéria *E. coli*, somente 15% das *E. coli* presentes no ambiente são consideradas potencialmente patogênicas, contribuindo assim para altos índices de condenação de carcaça em abatedouro [3,4].

Experimentos *in vivo* são usados para mensurar a capacidade da *E. coli* ser patogênica. Para tanto, usa-se a inoculação de animais e a observação da capacidade da bactéria causar lesões compatíveis com colibacilose. Um dos primeiros experimentos, realizado para comparar amostras patogênicas e apatogênicas de *E. coli*, tinha como objetivo relacionar índice de letalidade em pintos de 1 dia com fatores de virulência bacteriana [2].

A partir desse primeiro trabalho, diferentes autores propuseram distintos critérios de interpretação de resultados, embora a metodologia básica dos experimentos seja a mesma. Visualizando a literatura existente sobre o assunto, fica muito difícil o estudo da patogenicidade de amostras de *E. coli*. Essa dificuldade remete ao desenvolvimento de um método no qual seja avaliado, além da porcentagem de letalidade, o tempo entre a inoculação e a morte desses animais desafiados e a capacidade da amostra de produzir lesões características da enfermidade. Com essas informações, é possível estabelecer uma fórmula que represente de forma mais precisa possível os principais fenômenos biológicos subsequentes à inoculação bacteriana, proporcionando que distintas amostras tenham suas patogenias comparadas através de critérios objetivos e com validade estatística comprovada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras bacterianas

Foi utilizado um total de 293 amostras de *E. coli* de três diferentes fontes: 162 lesões cutâneas de celulite, 72 de cama de aviários pertencentes a 71 propriedades associadas a três diferentes integrações avícolas do Rio Grande do Sul, além de 59 amostras oriundas de quadros respiratórios em frangos de corte. As amostras pertenciam à bacterioteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) e foram confirmadas como *E. coli* através do perfil bioquímico, utilizando os meios Sulfite Indol Motility (SIM), Lisine Iron Agar (LIA), Triple Sugar Iron (TSI) e caldo uréia e armazenadas a -20° C em solução de glicerol a 50%.

Inóculo

Para a preparação do inóculo, foram retirados 100 µL de cultura e vertidos em 3 mL de BHI para crescimento a 37° por 24 h para obtenção de 10⁹ UFC/mL. Cada tubo foi homogeneizado durante 15 segundos por meio de agitador Vortex e colocado 0,1 mL dessa suspensão em 10 seringas hipodérmicas de 1 mL.

Desafio

Cada amostra era inoculada, via subcutânea, em 10 pintinhos fêmeas de 10 dias, com 0,1 mL na porção abdominal direita. Os controles foram desafiados da mesma maneira, porém com 0,1 mL de solução estéril de BHI. Os animais foram observados durante 7 dias com água e alimento *ad libitum*.

Estabelecimento de critérios para elaboração do índice de patogenicia

Para cada animal morto após o período de inoculação foi anotado o dia da morte. Na necropsia foram registradas lesões como aerossaculite, pericardite, peritonite, celulite e peri-hepatite. Essa metodologia considerou que animais mortos no primeiro

dia após o desafio e com isolamento de *E. coli* em ágar EMB caracterizaria a morte por septicemia; portanto, recebiam pontuação 1 (um), que é a máxima para o tempo de morte e para cada uma das lesões observadas. A cada dia que o animal sobrevivesse após o desafio, esse índice era decrescido em 0,14. Essa constante é produto da divisão da pontuação 1 pelos 7 dias que se observaram os animais como expresso no exemplo da Tabela 1. Essa constante foi denominada fator de bonificação de sobrevivência (FBS).

Tabela 1. Valores atribuídos ao tempo de morte pós-inoculação corrigido pelo fator de bonificação de sobrevivência (FBS).

| Dia da morte | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | S |
|--------------|---|------|------|------|------|------|------|---|
| FBS | 1 | 0,86 | 0,72 | 0,58 | 0,44 | 0,30 | 0,16 | 0 |

S = Sacrificados ao final do período de observação.

Ao tempo de morte, ou dia da morte, foi atribuído um peso 5, enquanto que as demais lesões observadas receberam peso 1, totalizando 10. O índice de patogenicidade individual (IPI) foi calculado de acordo com a fórmula:

$$IPI = (DM \times 5) + P + Pe + Ph + A + C$$

Onde IPI = Índice de patogenicidade individual; DM = Dia de Morte; P = Pericardite; Pe = Peritonite; Ph = Peri-hepatite; A = Aerossaculite; C = Celulite

O cálculo do índice de patogenicidade (IP) de cada amostra foi obtido da seguinte maneira:

$$IP = \frac{\sum (IPI_{ni})}{N}$$

IPI_{ni} = Soma do índice de patogenicidade de cada animal no grupo desafiado com a mesma cepa

N= nº de pintos inoculados.

A Tabela 2 exibe um exemplo de cálculo para uma amostra de *E. coli* que apresentou um IP de 4,79

Tabela 2. Exemplo do cálculo do índice de patogenia (IP) de amostra de *E. coli* inoculada em 10 pintos com um dia de idade.

| Amostra | Animal | DM | FBS | A | Pe | Ph | P | C | IP |
|---------|--------|-----|-------|----|----|----|----|----|-------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1* | 1* | 1* | 1* | 0* | 10*** |
| 1 | 2 | 2 | 0,857 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 7,29 |
| 1 | 3 | 2 | 0,857 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 9,29 |
| 1 | 4 | 3 | 0,714 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 8,57 |
| 1 | 5 | 4 | 0,571 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 6,86 |
| 1 | 6 | 4 | 0,571 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,86 |
| 1 | 7 | s** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 8 | S | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 1 | 9 | S | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 1 | 10 | S | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Total | | | | | | | | | 4,79 |

* Ocorrência de lesão = 1

* Ausência de lesão = 0

** S = Sacrificados no 7º dia pós-inoculação

*** Animais mortos no primeiro dia eram considerados positivos pra todas as lesões de septicemia a fim de maximizar o índice de patogenicidade.

DM= Dia de morte; FBS= Fator de bonificação de sobrevivência; A= aerossaculite; Pe= Peritonite; Ph= Perihepatite; P= Pericardite e C= Celulite

Análise Estatística

Os resultados foram agrupados conforme a procedência da amostra e analisados estatisticamente através do programa *SigmaStat for Windows*, versão 2.03.

RESULTADOS

A septicemia seguida de morte esteve presente nas amostras consideradas patogênicas e, muitas vezes, observou-se lesão de celulite em menos de 24 horas, confirmada por exame histopatológico. Outros autores, também encontraram um achado similar [5].

A Tabela 3 confirma a aplicabilidade desse modelo proposto, já que as amostras de *E. coli* provenientes de lesões de celulite e de quadros respiratórios obtiveram um índice de patogenia significativamente maior do que as amostras isoladas de cama de aviários. Ainda na Tabela 3, o coeficiente de variação maior das amostras de cama pode ser atribuído ao fato de que, no ambiente, 10 a 15% das amostras de fezes são patogênicas e o restante, apatogênicas [4].

Tabela 3. Média dos índices de patogenia de *Escherichia coli* conforme a origem das amostras.

| Origem da amostra | Número de amostras | Índice de Patogenicidade * | Coeficiente de Variação |
|-------------------|--------------------|----------------------------|-------------------------|
| Respiratória | 59 | 5,420±2,991 ^a | 55,16 |
| Lesão cutânea | 162 | 4,622±3,245 ^a | 70,21 |
| Cama | 72 | 2,319±2,292 ^b | 98,83 |

* Média ± desvio padrão

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,001$)

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

A Tabela 4 mostra que o novo método se adapta a quatro diferentes categorias propostas pelo modelo de Brito *et al.* [1]. Utilizou-se este método para classificar 293 amostras de bactérias usadas neste experimento, que estão distribuídas na primeira coluna de acordo com a classificação dos autores citados. Na terceira coluna o resultados de IP obtido no presente trabalho, por serem expressos numericamente, os dados nos permitem estabelecer diferenças significativas entre as categorias. Essa diferenciação entre categorias fica comprometida quando o critério é meramente qualitativo.

Tabela 4. Agrupamento de patogenia segundo Brito *et al* (2003) versus índice de patogenia, sem levar em conta a origem das amostras.

| Grupo | Nº de amostras | Índice de Patogenia (Mediana) | 25% | 75% |
|-------|----------------|-------------------------------|-------|-------|
| A | 96 | 8,159 ^a | 7,142 | 9,453 |
| I | 56 | 4,571 ^b | 3,778 | 5,582 |
| B | 107 | 1,685 ^c | 1,064 | 2,300 |
| AP | 34 | 0,300 ^d | 0,100 | 0,600 |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

A: Alta patogenicidade; I Patogenicidade intermediária; B Baixa patogenicidade e AP: Apatogênica

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,001$).

A: alta patogenicidade, I: Patogenicidade intermediária, B: Baixa patogenicidade, AP: Apatogênica.

No experimento que alicerça esse trabalho, foi demonstrado que existem distintas amostras bacterianas com patogenia variável e que as diferenças no índice médio de patogenia, porventura existentes entre granjas de uma integração, poderão ser estatisticamente caracterizadas e servir como orientação para as estratégias terapêuticas a serem adotadas pelos responsáveis (Tabela 5).

Tabela 5. Índices médios de patogenia de amostras de *E. coli* presentes em três diferentes granjas de uma integração avícola.

| Granja | Nº de amostras | Índice de Patogenicidade |
|--------|----------------|--------------------------|
| A | 5 | 7,54 ± 4,18 ^a |
| B | 5 | 8,52 ± 3,32 ^a |
| C | 6 | 2,14 ± 2,51 ^b |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,05$).

O conceito de dia de morte apresentado na Tabela 6 serve como um parâmetro interessante para se medir a capacidade que a bactéria possui de manifestação aguda e septicêmica. O que parece evidente é que as amostras respiratórias de celulite apresentam maior índice de dia de morte, refletindo, assim, o comportamento “agressivo” dessas amostras no campo. Outra situação que podemos observar em comparação às médias do dia de morte com os índices de patogenia é que somente nas amostras de isolados respiratórios esse escore subiu, o que significa que, nesse tipo de modelo, a origem tende a mostrar resultados diferentes, dependendo do tipo de critério

utilizado. Essa informação reforça a importância do FBS na tradução mais fiel do fenômeno biológico observado quando representado por um modelo matemático.

Tabela 6. Dia de morte dos animais de acordo com a origem do isolamento da *Escherichia coli*.

| Origem* | Nº de amostras | Índice Dia da Morte** (mediana) |
|---------------|----------------|---------------------------------|
| Cama | 61 | 1,43 ^a |
| Lesão | 144 | 4,0 ^b |
| Respiratórias | 59 | 5,7 ^b |

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Letras distintas na mesma coluna representam diferença significativa ($P \leq 0,05$).

** Valores com amplitude de 0 a 10 e computando o FBS.

CONCLUSÃO

Com a nova metodologia proposta neste trabalho, foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas entre os índices de patogenia das amostras. Isolados de *E. coli* provenientes de quadros respiratórios e de amostras de lesão de celulite possuem índice de patogenia maior que amostras bacterianas oriundas de cama. A utilização do cálculo do tempo de morte, corrigido pelo fator de bonificação de sobrevivência (FBS) e da presença de cinco tipos de lesões de colibacilose, refletiu adequadamente a virulência da amostra após a inoculação em pintinhos. Os índices de patogenia, com maiores coeficientes de variação, foram encontrados nas amostras oriundas das camas de aviários.

REFERÊNCIAS

- 1 Brito B.G., Gaziri L.C.J. & Vidotto M.C. 2003.** Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis. *Infection and Immunity*. 71(7): 4175-4177
- 2 Dho M. & Lafont J.P. 1982.** Escherichia Coli colonization of the trachea in poultry - comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. *Avian Diseases*. 26(4): 787-797.
- 3 Gomis S.M., Goodhope R., Kumor L., Caddy N., Riddell C., Potter A.A & Allan B. J. 1997.** Isolation of *Escherichia coli* from cellulitis and other lesions of the same bird in broilers at slaughter. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*. 38(3): 159-162.
- 4 Harry E.G & Hemsley L.A. 1965.** Relationship between environmental contamination with septicaemia strains of Escherichia Coli and their incidence in chickens. *Veterinary Record*. 77(9): 241-245.
- 5 Jeffrey J.S., Chin R.P. & Singer R.S. 1999.** Assessing cellulitis pathogenicity of Escherichia coli isolates in broiler chickens assessed by an in vivo inoculation model. *Avian Diseases*. 43(3): 491-496.

Anexo.4

**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. Av. Bento Gonçalves, 8824. Bairro: Agronomia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

² Coordenação Geral de Apoio Laboratorial, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, Brasil. Esplanada dos Ministérios Bloco D - Anexo B –Térreo Caixa Postal 02432 CR-MAPA, CEP: 70043-900, Brasília – DF

Primeiro Autor: Felipe de Oliveira Salle. Av. Cavalhada, 4760, bloco: B7 – AP.: 126. Bairro: Cavalhada, CEP: 91740-000. Porto Alegre. Rio Grand do Sul. E-mails: sallefelipe@gmail.com, felipesalle@netscape.net

RESUMO

Descritores: *Escherichia coli*, bioquímismo, redes neurais artificiais

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 principal conclusão deste artigo 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

Keywords: *Escherichia coli*, Biochemical reactions, Artificial neural network

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 main conclusion of this paper 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 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 [5]. No entanto, o sistema deve ser alimentado com dados reais que permita seu

treinamento e aprendizado. Assim, ela é capaz de extrair regras básicas a partir de dados reais [1].

A *E. 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 [3]. Os mecanismos de virulência das amostras de *E. coli* potencialmente patogênicas para aves (APEC), tem sido continuamente estudados e acredita-se serem multifatoriais.

Recentemente, Fortes(2008) [2] 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. Já 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 foi construir redes neurais artificiais para prever os resultados dos testes bioquímicos variáveis relatados por Fortes(2008) [2]. Como entradas, utilizaram-se informações já existentes ou novas. Neste último caso está a resistência antimicrobiana [4].

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 (Amicacina, Amoxicilina e Ácido clavulânico, Ampicilina, Cefalexina, Cefuroxina, Ceftiofur, Ciprofloxacina, Clindamicina, Cotrimoxazol, Enrofloxacina, Gentamicina, Norfloxacina, Ofloxacina, 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 patogenidade, as lesões induzidas em pintos de um dia de idade, a caracterização dos genes associados à patogenicidade, a resistência antimicrobiana, a origem das amostras e a motilidade das amostras. As saídas foram as reações bioquímicas variáveis obtidas por Fortes (2008) [2]: ornitina, arginina, adonitol, rafinose, sacarose, salicina e dulcitol.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentadas as características das redes neurais artificiais construídas com as entradas Resistência antimicrobiana (Antib), Genes associados à patogenicidade (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) [2].

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.

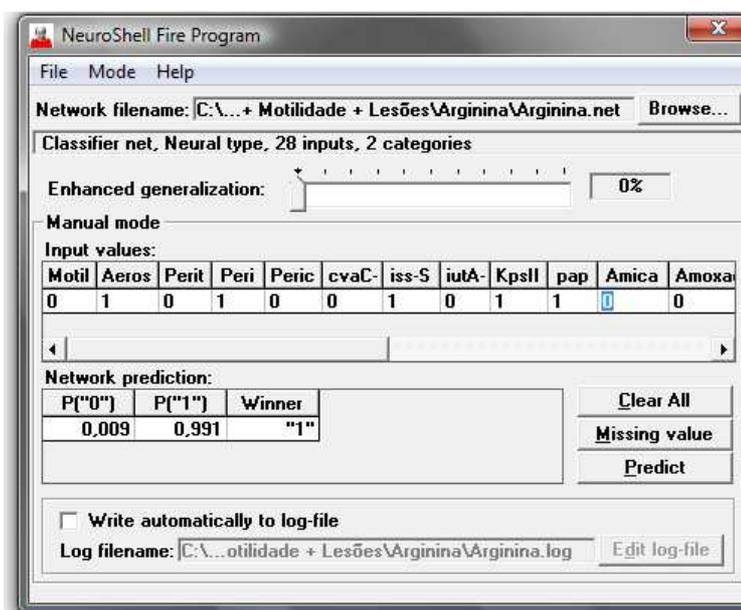


Figura 1. Interface para a colocação dos dados de entrada para a obtenção do resultado Negativo (0) ou Positivo (1) para a saída Arginina.

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; caracterização dos genes associados à patogenicidade, resistência antimicrobiana a 14 antibióticos, origem das amostras e da motilidade bacteriana.

REFERÊNCIAS

- 1 **Forsström J.J.; Dalton K.J. 1995.** Artificial neural networks for decision support in clinical medicine. In: *Annals of Medicine*. 27: 509-517.
- 2 **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.
- 3 **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.
- 4 **Salle F.O. 2009.** 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. 88f. Porto Alegre, RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5 Tatibana C.Y.; Kaetsu D.Y. 2004. Uma Introdução as Redes Neurais.

[Fonte: <<http://www.din.uem.br/ia/neurais>>].

Anexo 5, Resultados gerais das predições quanto ao número de lesões formadas, obtidos de RNA que utilizaram como entrada, os fatores de virulência e origem dos isolados.

| Lesão | Aerossaculite | Pericardite | Peritonite | Celulite | Periepatite |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Predição Correta | 181 (62,41%) | 183 (63,10%) | 189 (65,17%) | 153 (52,76%) | 196 (67,59%) |
| Predição Incorreta | 109 (37,59%) | 107 (36,90%) | 101 (34,83%) | 137 (47,24%) | 94 (32,41%) |