

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

**UTILIZAÇÃO DE REDES NEURAS ARTIFICIAIS PARA A
CLASSIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SUA
RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE 38 GENES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA
ISOLADOS DE AMOSTRAS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DE
FRANGOS DE CORTE**

Dissertação de Mestrado

Daniela Tonini da Rocha

PORTO ALEGRE

2012

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

**UTILIZAÇÃO DE REDES NEURAS ARTIFICIAIS PARA A
CLASSIFICAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SUA
RELAÇÃO COM A PRESENÇA DE 38 GENES ASSOCIADOS A VIRULÊNCIA
ISOLADOS DE AMOSTRAS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES DE
FRANGOS DE CORTE**

Autora: Daniela Tonini da Rocha.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Sanidade Avícola.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes.

PORTO ALEGRE

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Tonini da Rocha, Daniela

Utilização de Redes Neurais Artificiais para a Classificação da Resistência a Antimicrobianos e sua relação com a presença de 38 genes associados a virulência isolados de amostras de Escherichia coli provenientes de frangos de corte / Daniela Tonini da Rocha. -- 2012.

48 f.

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Escherichia coli. 2. Redes Neurais Artificiais. 3. Antimicrobianos. I. Luiz de Souza Moraes, Hamilton, orient. II. Título.

Daniela Tonini da Rocha

“Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação da resistência a antimicrobianos e sua relação com a presença de 38 genes associados a virulência isolados de amostras de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte.”

Aprovada em 18 de DEZ de 2012.

APROVADA POR:

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Orientador e Presidente da Comissão

Dr. Benito Guimarães de Brito
Membro da Comissão

Dr. Adriano da Silva Guahyba
Membro da Comissão

Dr. Guilherme Fonseca de Souza
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me agraciado com a oportunidade da vida.

A minha mãe, que por pouco tempo que esteve presente, me ensinou os princípios da vida, modelando meu caráter e guiando meus passos. À minha família, que me incentivou a ir em busca dos meus sonhos e objetivos.

Ao Felipe, uma pessoa especial, apareceu na minha vida e eu agradeço muito por isso, seu apoio, sugestões e ensinamentos contribuíram para o desenvolvimento deste estudo.

Ao meu orientador, professor Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes, por ter me concedido a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos, também pelas sugestões e correções feitas ao longo deste trabalho, só tenho a agradecer.

Ao professor Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle, obrigada pela confiança e por toda a atenção dispensada, e, principalmente, pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis desta trajetória.

E a todos que de uma maneira ou outra contribuíram na realização desse trabalho, funcionários, colegas de pós-graduação e estagiários. Em especial ao amigo Gustavo.

Não poderia deixar de citar meus amigos do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Ana Paula, Camila, Taís, Elton, Samuel, que me auxiliaram em uma etapa importante de aprendizado, muito obrigada.

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

RESUMO

A *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC), pertence à família *Enterobacteriaceae*, é responsável por vários processos patológicos nas aves, atuando como agente primário ou secundário na aerossaculite, pericardite, perihepatite, peritonite, salpingite, onfalite, celulite, entre outros. O presente estudo aborda a resistência a antimicrobianos de amostras de *E. coli* (APEC) de uma forma inovadora, utilizando como ferramenta as redes neurais artificiais, metodologia inserida na linha de pesquisa do CDPA (Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária). A utilização de inteligência artificial, especificamente, as redes neurais artificiais (RNAs), está sendo crescentemente empregada como ferramenta para a análise de dados não lineares e multivariados, característica comum em fenômenos biológicos. O objetivo do presente trabalho foi demonstrar que é possível prever o uso de antimicrobianos, utilizando trinta e oito genes responsáveis por distintos fatores de virulência, oriundos das amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango de corte, através das redes neurais artificiais (RNAs). Além disso, verificou-se a relação entre o índice de patogenicidade (IP) e a resistência aos quatorze antimicrobianos que fazem parte do banco de dados usado para o desenvolvimento deste estudo. Neste trabalho foram utilizados os dados disponíveis referentes a 256 amostras de *E. coli* isoladas de camas de aviários, lesões de celulite e quadros respiratórios de frangos de corte. Para a confecção das redes neurais artificiais as entradas escolhidas foram: os índices de patogenicidade, as lesões induzidas em pintos de um dia de idade, a caracterização dos genes associados à patogenicidade, o bioquimismo, a origem das amostras e por fim, a motilidade. As redes neurais artificiais foram criadas realizando associações entre as variáveis de entrada com o objetivo de encontrar o modelo mais ajustado. As saídas utilizadas de acordo com Salle (2009) foram o comportamento das cepas de *Escherichia coli* frente aos 14 antimicrobianos. Para verificar se existia diferença significativa entre as médias dos índices de patogenicidade (IP) e as amostras sensíveis e resistentes aos 14 antimicrobianos utilizados neste estudo, realizou-se análise estatística com o auxílio do software JMP® 9.0.1 (SAS Institute Inc., 2010). Os resultados obtidos demonstram que as redes neurais artificiais foram capazes de realizar a classificação correta do comportamento das amostras com amplitude de 74,22% a 98,44%, desta forma tornando possível prever a resistência antimicrobiana da *Escherichia coli*, através de modelo das RNAs. A análise estatística realizada para verificar a relação entre o IP e a resistência aos 14 antimicrobianos demonstrou que estas são variáveis independentes. Ou seja, podem haver picos no IP sem alteração na resistência antimicrobiana, ou até mesmo o contrário, alterações na resistência antimicrobiana sem mudanças no IP.

Palavras chaves: *Escherichia coli*, redes neurais artificiais, antimicrobianos.

ABSTRACT

The avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), belongs to the family *Enterobacteriaceae*, is responsible for various pathological processes in poultry, acting as an agent in the primary or secondary lesion such as: sacculitis, pericarditis, perihepatitis, peritonitis, salpingitis, omphalitis, cellulitis, among others. This study addresses the antimicrobial resistance of *E. coli* (APEC) strains in an innovative way, using tools such as artificial neural networks, methodology embedded in the CDPA's search line (Center for Diagnostics and Research in Avian Pathology). The use of artificial intelligence, specifically artificial neural networks (ANNs), is being increasingly used as a tool for data analysis and nonlinear multivariate, common feature in biological phenomena. The objective of this study was to demonstrate that it is possible to predict the use of antimicrobials, using thirty-eight distinct genes responsible for virulence factors, derived from *Escherichia coli* isolates from broiler, through artificial neural networks (ANNs). Besides, it was found the relationship between pathogenicity index (PI) and resistance to fourteen antimicrobial forming part of the database used for the development of this study. In this study was used the data available for 256 samples of *E. coli* isolated from broiler litter, lesion of cellulitis and respiratory symptoms in broilers. To make the neural network inputs have been chosen: the indices of pathogenicity, the induced lesions in chicks at day old, characterization of genes associated with pathogenicity, biochemism, the source of samples and finally motility. Artificial neural networks have been created making associations between the input variables in order to find the best adjusted model. The outputs used according Salle (2009) was the behavior of *Escherichia coli* strains compared to 14 antimicrobials. To check whether there was a significant difference between the average indices for pathogenicity (IP) and the sensitive and resistant samples to 14 antimicrobials used in this study, statistical analysis was performed with the help of software JMP ® 9.0.1 (SAS Institute Inc., 2010). The results show that artificial neural networks were able of performing correct classification of the behavior of the samples with an amplitude of 74.22% to 98.44%, thereby making it possible to predict the antibiotic resistance of *Escherichia coli*, using ANNs model. The statistical analysis performed to assess the relationship between IP and resistance to 14 antibiotics showed that these variables are independent. That is, it can happen peaks in IP without change in antimicrobial resistance, or even the opposite, changes in antimicrobial resistance without changes in IP.

Key-words: *Escherichia coli*, artificial neural networks, antimicrobials.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação da resistência bacteriana (intermediária, resistente ou sensível) de 256 amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de frangos de corte frente a 14 antimicrobianos através do uso de redes neurais artificiais, usando como entrada os 38 genes associados a virulência.....	33
Tabela 2	Antimicrobiano e sua média do índice de patogenicidade (IP).....	35

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Exemplo de rede neural artificial	26
Figura 2 - Layout do programa de redes neurais artificiais – saída selecionada: o antimicrobiano cotrimoxazol	31
Figura 3 - Layout do programa de redes neurais artificiais – saída selecionada: o antimicrobiano clindamicina	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
APEC	Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i>
BHI	Brain-Heart Infusion
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DRC	Doença Respiratória Crônica
EMB	Eosyn-Methylene-Blue
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> Extraintestinal
IP	Índice de Patogenicidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MLP	Multilayer Perceptron
PIB	Produto Interno Bruto
RNAs	Redes Neurais Artificiais
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatogênica
ANNs	Artificial Neural Networks
PCR	Polymerase Chain Reaction

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	Revisão Bibliográfica	13
2.1	<i>Escherichia coli</i>	13
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária (APEC)	14
2.1.2	Fatores de virulência	16
2.1.3	Tratamento, controle e prevenção	19
2.1.4	Resistência antimicrobiana por <i>Escherichia coli</i>	21
2.2	Inteligência Artificial: Redes Neurais Artificiais (RNAs)	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4	RESULTADOS	33
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÕES	40
7	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira tem se destacado pela sua extensão territorial, clima, tecnologia, mão-de-obra, autossuficiência em grãos e logística de transporte, refletindo em altos índices produtivos, o que torna o Brasil atualmente o terceiro maior produtor e o maior exportador mundial de carne de frango. Tanto a qualidade como a imagem de produto saudável e preços acessíveis, também tem auxiliado na manutenção dessa posição.

A importância social da avicultura no Brasil também é relevante, esta atividade emprega mais de 4,5 milhões de pessoas de forma direta e indiretamente, e responde a quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) Nacional. O crescimento observado em 2011 foi impulsionado principalmente pelo aumento no consumo de carne de frango e pela expansão nas exportações. Sendo que, a produção de carne de frango em 2011 foi superior a 13 milhões de toneladas, com um crescimento de 6,8% em relação a 2010. Com este desempenho o Brasil se aproxima da China, o segundo maior produtor mundial (UBABEF, 2012).

Por outro lado, nos atuais modelos de produção têm-se observado o aumento da ocorrência de vários microrganismos que prejudicam a qualidade final do produto. Dentre esses, emerge a *Escherichia coli* (*E. coli*), que foi por muito tempo esquecida como potencial patógeno, destaca-se devido aos prejuízos econômicos que gera, seja pela condenação total e/ou parcial de carcaças como em gastos com medicamentos (KABIR, 2010).

Em muitos casos o uso de antimicrobianos tem se mostrado ineficaz, principalmente devido a indução de resistência bacteriana em razão do uso indiscriminado e prolongado, em concentrações sub-terapêuticas e indicações terapêuticas ineficientes (ANDREATTI FILHO, 2006; FERREIRA & KNÖBL, 2009). Além disso, as restrições crescentes quanto a utilização de medicamentos em animais destinados ao consumo humano e os prejuízos econômicos relacionados às lesões causadas pela *E. coli*, demonstram a necessidade de adotar novas metodologias capazes de classificar a resistência a antimicrobianos, para que desta forma, quando se opte por um tratamento, este seja escolhido com critérios sendo assim, seguro e eficaz.

Acredita-se que uma das ferramentas que possui potencial para o auxílio nesta tarefa é a utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais - RNAs), como ferramenta para tomada de decisões. No Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foram desenvolvidos projetos de pesquisas, sob a forma de dissertações de mestrado e teses de doutorado, que utilizam a inteligência artificial, mais especificamente as redes neurais

artificiais (RNAs). em distintos fenômenos próprios da cadeia produtiva avícola. Podem ser citados os seguintes nichos da avicultura que foram utilizados: o gerenciamento da produção de reprodutoras pesadas, a produção de frangos de corte, os fenômenos envolvidos no incubatório, além das diversas variáveis que puderam ser observadas e analisadas no abatedouro. As redes neurais artificiais igualmente propiciaram resultados positivos e de significativa importância quando conseguiram relacionar os índices de patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* aos fatores de virulência. Essa mesma tecnologia conseguiu classificar e relacionar a resistência a antimicrobianos, o comportamento bioquímico e a patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte. E por fim, mas não menos importante pode-se citar a utilização da inteligência artificial para auxiliar no diagnóstico de análise digital de imagem para avaliar a depleção linfóide, alcançando resultados positivos e inovadores quando se fala em diagnóstico laboratorial.

O objetivo do presente trabalho foi demonstrar que é possível prever a resistência antimicrobiana de amostras de *E. coli* (APEC), utilizando trinta e oito genes responsáveis por distintos fatores de virulência oriundos das amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte, através das redes neurais artificiais (RNAs). Além disso, verificou-se a relação entre o índice de patogenicidade (IP) e a resistência aos quatorze antimicrobianos que fazem parte do banco de dados usado para o desenvolvimento deste estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* que foi descrita pela primeira vez em 1885 por Theodor von Escherich, sendo chamada de *Bacterium coli commune*, inicialmente foi identificada como parte da microbiota entérica da maioria dos animais, sendo considerada durante muito tempo como um microrganismo não patogênico. No entanto, após alguns sorotipos de *E. coli* serem associados às doenças em animais e seres humanos, esta caracterização foi modificada (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

A *E. coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo um bastonete Gram-negativo, não esporulado, podendo ser móvel ou imóvel, anaeróbio facultativo, com tamanho variando entre 1,1 a 1,5 µm por 2 a 6 µm. Esta bactéria é de fácil cultivo laboratorial, não exigindo meios de cultura diferenciados ou condições especiais, seu crescimento ocorre em temperaturas entre 18°C a 44°C, em ágar MacConkey as colônias se apresentam na cor rosa clara circundadas por um precipitado, e em ágar EMB (Eosyn – Methylene – Blue), são verde escuras com tom metálico ou pretas (ANDREATTI FILHO, 2006; BARNES *et al.*, 2008; BACK, 2010).

Em relação ao comportamento bioquímico, a *E. coli* tem como características a produção de ácido e gás após a fermentação da glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramnose, sorbitol e arabinose. A fermentação do adonitol, sacarose, salicilina, rafinose, ornitina, dulcitol e arginina é variável. A maioria das amostras possui capacidade para fermentar a lactose, embora algumas realizem este processo de forma mais lenta. Os testes de oxidase, utilização do citrato, hidrólise de ureia, liquefação de gelatina, a reação de Voges Proskauer e a produção de H₂S são negativos, enquanto a motilidade, lisina, produção de indol e a reação de vermelho de metila têm respostas positivas. As provas bioquímicas para *E. coli* são úteis para diferenciá-la das outras espécies de *Escherichia* e de outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* (ANDREATTI FILHO, 2006; BARNES *et al.*, 2008; FERREIRA & KNÖBL, 2009; OLIVEIRA, 2012).

As amostras de *E. coli* possuem diversos determinantes antigênicos localizados principalmente, na parede celular, como antígenos somáticos (O), antígenos flagelares (H), antígenos capsulares (K) e fimbrias (P), os quais são usados para a realização de sorotipagem em *E. coli*.

Os antígenos somáticos, além de determinarem a existência de vários sorogrupos, correspondem a uma das frações do maior componente encontrado na parede celular das bactérias Gram negativas, o lipopolissacarídeo (LPS).

Os antígenos flagelares são de natureza proteica e não são utilizados com frequência na identificação antigênica das amostras de *E. coli*, a presença de flagelo não tem sido correlacionada com a patogenicidade.

Os antígenos capsulares são compostos de polissacarídeos e os antígeno fimbriais “F” são denominados pelos termos adesinas, pili ou fimbrias, e correspondem a moléculas de natureza protéica, que recobrem a superfície bacteriana, capazes de reconhecer receptores específicos na superfície das células eucarióticas (QUINN, 2005; FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Muitos pesquisadores em todo o mundo têm procurado determinar quais os sorogrupos de *E. coli* causadores de patologias em frangos. Os principais sorotipos relacionados com a colibacilose aviária são O1:K1, O2:K2, O36 E O78:K80, embora outros sorogrupos como o O4, O6, O11, O21, O50, O88, O119, possam ser isolados. No Brasil, os sorogrupos mais prevalentes são: O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119, O152, e muitas amostras patogênicas não pertencem a nenhum destes grupos somáticos “O”, sendo caracterizadas como não tipificáveis sorologicamente. Devido à presença dos antígenos O, K e H, as espécies de enterobacteriáceas podem ser divididas em sorogrupos e sorotipos. A sorotipificação é um procedimento caro e realizado somente em alguns centros especializados, sendo desnecessária para diagnósticos laboratoriais de rotina, mas de grande valor para estudos epidemiológicos (GROSS, 1994; TRABULSI; ORDOÑEZ; MARTINEZ, 2008; FERREIRA & KNÖBL, 2009).

2.1.1 *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC)

A *Escherichia coli* é responsável por vários processos patológicos nas aves, atuando como agente primário ou secundário na aerossaculite, pericardite, perihepatite, peritonite, salpingite, onfalite, sinovite, coligranuloma, síndrome da cabeça inchada, celulite, entre outros (ANDREATTI FILHO, 2006; KABIR, 2010). O termo colibacilose vem sendo empregado para estas infecções localizadas ou sistêmicas, as quais são causadas total ou parcialmente pela *E. coli* potencialmente patogênica para aves (APEC) (BARNES *et al.*, 2008).

A rota natural de infecção pela APEC ainda não está claramente elucidada, embora as vias: oral e respiratória parecem ser as principais portas de entrada (DZIVA & STEVENS, 2008). O trato intestinal das aves é normalmente colonizado por esta bactéria, podendo ser encontrada em uma concentração de 10^6 unidades formadoras de colônias por grama (UFCs/g) de fezes, sendo que aproximadamente 10 a 20% dos coliformes fecais são representados por sorotipos de *E. coli* potencialmente patogênicos, a excreção de *E. coli* pelas fezes é contínua, o que torna a sua distribuição cosmopolita (FERREIRA & KNÖBL, 2009; BACK, 2010).

O aparecimento da colibacilose é o resultado da interação bactéria, hospedeiro e o meio ambiente caracterizando a tríade epidemiológica, e esta interatividade depende da virulência da cepa, do sistema imunológico da ave, além da presença de outros fatores predisponentes. A *E. coli* torna-se clinicamente aparente quando fatores ambientais adversos estão presentes, como a amônia, umidade da cama, poeira, variação climática, alta densidade, além da presença de outros agentes patogênicos, tais como os pertencentes ao gênero *Mycoplasma*, o vírus da bronquite infecciosa, o vírus da doença de Newcastle entre outros (ANDREATTI FILHO, 2006; DZIVA & STEVENS, 2008; BACK, 2010; KABIR, 2010).

Entre as doenças causadas pela APEC, pode-se citar a onfalite, que ocorre quando a contaminação fecal do ovo acontece devido a penetração de cepas patogênicas da superfície para o interior da casca, podendo causar a morte embrionária. Além da contaminação fecal, existe também a possibilidade de contaminação transovariana (salpingite), que pode ser resultado de uma infecção ascendente a partir da cloaca, ou pela proximidade do oviduto com as membranas do saco aéreo abdominal. As aves acometidas pela salpingite diminuem drasticamente a produção de ovos e pode-se verificar uma mortalidade esporádica (BARNES *et al.*, 2008; KABIR, 2010).

A doença respiratória crônica (DRC) destaca-se por sua relevância em frangos de corte, em razão das perdas econômicas decorrentes das condenações no abatedouro e da mortalidade. Neste caso, a porta de entrada mais frequente para bactéria é o trato respiratório superior ocorrendo a multiplicação do agente na traqueia com posterior disseminação para os sacos aéreos e tecidos adjacentes. Esta rota de infecção é considerada como a principal origem de colibacilose sistêmica ou colisepticemia (ANDREATTI FILHO, 2006; FERREIRA & KNÖBL, 2009; KABIR, 2010).

Outra doença associada a infecção por *E. coli* que acomete frangos de corte, resultando em um grande número de condenações no abatedouro, devido ao aspecto repugnante da carcaça, é a celulite (NORTON; BILIGILI; MCMURTREY, 1997; BRITO *et al.*, 2002; FERREIRA & KNÖBL, 2009).

A celulite é uma reação inflamatória difusa que resulta de infecção subcutânea, caracterizada pela presença de exsudato, espessamento de pele e placas fibrinocaseosas (ANDREATTI FILHO, 2006), que se localiza principalmente nas regiões de abdômen e sobrecoxa, podendo estar presente também em cabeça e pescoço, coxa, dorso, asas, peito e região cervical, sendo frequentemente unilateral (OLKOWISK *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2006).

Em estudo desenvolvido por Olkoswski *et al.* (2005), foram avaliadas duas linhagens de aves: uma de frangos de corte comercial e outra de aves da raça Leghorn (resistente à celulite). Nestes dois grupos o experimento analisou variáveis tais como: características estruturais da pele, as propriedades físico-químicas e respostas celulares para o desafio à patógenos. Os pesquisadores observaram diferenças significativas entre as aves da raça Leghorn e os frangos de corte, que apresentaram lesões de pele mais severas, e uma área lesada mais significativa. O trabalho demonstrou que a predisposição dos frangos de corte para a celulite parece estar relacionada principalmente com a primeira linha de defesa da pele, na qual a mobilização de células fagocíticas não é tão eficiente nos frangos de corte quando comparados com aves da raça Leghorn.

Esta é uma doença de etiologia multifatorial, pois são necessários pelo menos dois fatores para a sua ocorrência. A necessidade de um trauma qualquer que resulte em ferimento na pele, e a presença maciça de contaminação por *E. coli* são fatores que condicionam o aparecimento da celulite (NORTON; BILIGILI; MCMURTREY, 1997).

Este verdadeiro complexo de processos patológicos que caracteriza a colibacilose faz com que esta doença tenha relevância no cenário da avicultura industrial moderna, devido aos grandes prejuízos econômicos, os quais podem ser exacerbados pelas perdas ocasionadas por condenações de carcaças, aumento de mortalidade embrionária, do menor desenvolvimento corpóreo da ave, do aumento do índice de conversão alimentar, do aumento da mortalidade e além disso, dos gastos com medicamentos. (ANDREATTI FILHO, 2006; KABIR, 2010; WANG *et al.*, 2010).

2.1.2 Fatores de virulência

A evolução de muitas bactérias por transferência horizontal de genes facilita a adaptação a novos ambientes e contribui também para a capacidade de aquisição de fatores de virulência envolvidos diretamente em infecções. A composição do genoma bacteriano pode ser mudado drasticamente por uma variedade de processos que incluem a transferência

horizontal de genes, fundamental para o processo da evolução bacteriana. Esse processo adaptativo faz com que ocorra a incorporação de elementos genéticos de outros organismos diretamente no genoma. Em procariotos, pelo menos três mecanismos de transferência horizontal de genes são conhecidos: transformação, transdução e conjugação (HACKER & KAPER, 2000; DAM & DAS, 2006; MADIGAN *et al.*, 2010).

A transferência horizontal de genes é fundamental não só para evolução dos organismos em geral, mas também para as bactérias patogênicas, já que parte dos genes que codificam os fatores de virulência, surgem através desse artifício.

Alguns genes de virulência são carregados em plasmídeos ou bacteriófagos lisogênicos. Entretanto, muitos outros estão agrupados em regiões cromossômicas denominadas ilhas de patogenicidade (MADIGAN *et al.*, 2010). As ilhas de patogenicidade são constituintes genéticos de diferentes cromossomos bacterianos que tem a função de codificar vários genes de virulência (SCHMIDT & HENSEL, 2004).

A comparação entre o genoma das bactérias patogênicas com o de organismos não patogênicos, frequentemente revela blocos adicionais de material genético contendo genes que codificam fatores de virulência, proteínas especiais, ou outras estruturas necessárias para causar doença (MADIGAN *et al.*, 2010).

A patogenicidade em *E. coli* é um mecanismo multifatorial e complexo que envolve distintos fatores de virulência que variam de acordo com o sorotipo. O termo fator de virulência é impreciso, pois um único componente poderia não ser suficiente para transformar uma cepa de *E. coli* apatogênica em patogênica, no entanto, a combinação com outros fatores determinantes de virulência, poderiam ter um papel decisivo para tal processo mutagênico (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000; DOBRINDT *et al.*, 2004).

Os fatores de virulência mais frequentemente identificados em amostras de *E. coli* isolada de aves são: a capacidade de adesão, a presença de aerobactina, a produção de colicinas, (que são substâncias capazes de inibir o crescimento de outras bactérias presentes no mesmo nicho onde as *E. coli* se encontram). Além disso, pode-se citar: a resistência sérica, a motilidade, a produção de hemolisinas, a presença de plasmídios, a produção de toxinas (em alguns grupos), a habilidade de colonização e persistência na circulação, a invasividade celular e por fim, a multiresistência a drogas antimicrobianas (ASSIS & SANTOS, 2005; ROCHA *et al.*, 2008).

Em relação as adesinas, complexos proteicos que permitem a adesão e invasão bacteriana, sabe-se que estas estruturas contribuem para a virulência ativando vias de sinalização nas células bacterianas e no hospedeiro (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

As adesinas podem ser fimbriais ou não, as adesinas fimbriais mais importantes são: fimbrias tipo 1 e fimbrias P. As fimbrias do tipo 1 são comumente encontradas em APEC, com frequências variando de 70% a 100% (DZIVA & STEVENS, 2008; ANTÃO; WIELER; EWERS, 2009).

De acordo com os experimentos realizados por Kariyawasam & Nolan (2011), a fimbria P foi considerada um importante marcador de virulência da *E. coli*. Neste estudo observou-se que duas das cepas APEC que foram analisadas, possuíam genes de resistência para tetraciclina e estreptomicina na região papA.

A resistência sérica é outro mecanismo importante de virulência da APEC, e pode desempenhar um papel na patogênese da colibacilose aviária, visto que bactérias sensíveis ao soro são incapazes de colonizar órgãos internos (MELLATA *et al.*, 2003; DZIVA & STEVENS, 2008). Os genes de virulência responsáveis pela resistência sérica conferem à bactéria resistência aos efeitos bactericidas do soro do hospedeiro, podendo causar bloqueio do complexo terminal do sistema complemento que atua na membrana celular e provocar a lise da célula (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999). Dentre os genes envolvidos na resistência sérica da APEC pode-se citar os seguintes genes: o gene que codifica a proteína Iss (*increased serum survival*), a proteína TraT codificada pelo gene *traT* (*Transfer Protein*), o gene cromossômico *ompA* (*Outer membrane protein*) que codifica uma proteína da membrana externa, e os genes *kpsMT II* (*Group II capsule antigens*) que codificam as proteínas KpsM (ARRECUBIETA *et al.*, 2001; NOLAN *et al.*, 2003; DZIVA & STEVENS, 2008).

Os pesquisadores Silva *et al.* (2011), coletaram 62 amostras de fígados de frangos, sendo 30 macroscopicamente inalterados e 32 com alteração macroscópica que ocasionaram descarte das carcaças. Os autores isolaram 30 cepas de *Escherichia coli*, sendo 21 isoladas de fígados inalterados e nove provenientes de carcaças rejeitadas. O gene de resistência sérica (iss) foi observado em 83,3% (25/30) dos isolados, sendo 76,2% (16/21) provenientes de fígados de animais hígidos.

Em um estudo realizado por Rocha *et al.* (2008), foi pesquisado um total de 61 amostras de *E. coli*, isoladas de frangos de corte com problemas respiratórios, para a presença dos genes responsáveis pela capacidade de adesão, fimbria P (papC) e fimbria F11 (felA), produção de colinas (cvaC), presença de aerobactina (iutA), resistência sérica (iss), hemaglutinina temperatura sensível (tsh) e presença de antígenos capsulares K1 e K5 (kpsII). Como resultado os autores observaram que o gene mais detectado foi o iss (73,8%), seguido de tsh (55,7%), iutA (45,9%), felA (39,3%), papC (24,3%), cvaC (23%) e kpsII (18%).

A capacidade das bactérias patogênicas para sequestrar ferro, a partir de fluídos corporais, é considerada crucial para a virulência, e em APEC esta característica tem sido associada com a letalidade para pintos de um dia. Embora, um certo número de mecanismos de aquisição de ferro existir em agentes patogênicos Gram-negativos, o sistema aerobactina é de longe o mais bem caracterizado (DZIVA & STEVENS, 2008). Quase todas as espécies de bactérias requerem ferro, pois este é um elemento essencial, participa de inúmeros processos biológicos como o transporte de oxigênio, a regulação gênica e a síntese de DNA (MADIGAN *et al.*, 2010; GYLES, 2011).

Várias espécies de bactérias são claramente patógenos invasivos, penetram as barreiras epiteliais ou endoteliais e acessam tecidos subjacentes (GYLES, 2011). A forma pela qual a APEC atinge a circulação sistêmica, ainda não é conhecida. Consequentemente, não se sabe se a entrada na circulação sanguínea ocorre pela invasão do epitélio ou pela fagocitose dos macrófagos (DZIVA & STEVENS, 2008). Entre os genes de virulência associados à invasão em cepas APEC encontram-se o homólogo de proteína Tia (*toxigenic invasion locus in ETEC strains*), a ilha de patogenicidade *gimB* (*Geneticis land associated with new born meningitis*) e o gene *ibeA* (*Invasion of brain endothelium*) (EWERS *et al.*, 2007).

2.1.3 Tratamento, controle e prevenção

Os antimicrobianos, embora de grande utilidade no controle das infecções bacterianas, apresentam limitações, que devem ser analisadas em relação ao custo e benefício. O antimicrobiano escolhido deverá apresentar atividade contra as amostras de *E. coli* responsáveis pelo processo patológico. O ideal, é que antes de iniciar a administração de qualquer droga, sejam realizados testes de susceptibilidade com as amostras isoladas, já que em diversos casos, o uso de drogas tem se mostrado ineficaz, devido ao uso indiscriminado, com concentrações e/ou tempo de tratamento errôneos ocasionando um elevado índice de resistência aos antimicrobianos disponíveis no mercado (ANDREATTI FILHO, 2006; BARNES *et al.*, 2008).

As principais limitações relacionadas ao tratamento da colibacilose são os custos das medicações e a existência de amostras resistentes a mais de uma droga antimicrobiana (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Para atuar no controle e prevenção da colibacilose deve-se melhorar as condições de criação das aves levando em consideração, neste aspecto, questões de manejo e instalações. O controle da ventilação, a alimentação de qualidade, a intensificação no número de coleta dos

ovos no matrizeiro, a higienização adequada dos ovos e do incubatório reduzem significativamente as chances de onfalite. A limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos também são medidas profiláticas que auxiliam a diminuir a contaminação dos aviários (KABIR, 2010).

Outra forma de prevenção da infecção por *E. coli* em aves é pela imunização, vacinas inativadas (bacterinas) têm sido utilizadas em algumas regiões com a finalidade de minimizar o impacto de salpingite em matrizes e aves de postura comercial. Porém, o maior obstáculo no sucesso da vacinação é o fato de existir vários sorotipos patogênicos de *E. coli* e os anticorpos não possuem efeito de proteção cruzada entre os sorotipos (ANDREATTI FILHO, 2006; FERREIRA & KNÖBL, 2009; BACK, 2010; GREGERSEN *et al.*, 2010).

Segundo Kabir (2010), a imunização passiva de aves jovens, através das matrizes, é eficiente por duas semanas, caso as aves sejam desafiadas com sorotipos homólogos. As vacinas baseadas em fatores de virulência como fimbrias, também podem fornecer uma proteção homóloga boa, ou seja, contra as cepas APEC que possam possuir os mesmos tipos de fimbrias.

Os avanços na biologia molecular criaram novas cepas vacinais eficazes contra as cepas APEC. A deleção do gene (*aroA*), que é necessário ao metabolismo de aminoácidos cíclicos, resulta em perda de virulência. Esta vacina, *Escherichia coli* Poulvac® fabricada pela Fort Dodge Animal Health, tem sido amplamente utilizada nos Estados Unidos da América (SHANE, 2009). No Brasil a vacina Poulvac *E. coli* é indicada para o controle preventivo dos problemas causados pela *E. coli* em frangos de corte, poedeiras comerciais e reprodutoras.

Segundo o pesquisador Shane (2009), um estudo foi realizado na universidade de Auburn para avaliar o impacto da vacina Poulvac *E. coli* sobre o IP e o desempenho de frangos de corte. No experimento foram inoculadas cepas bacterianas por via subcutânea para reprodução de quadros de celulite nas aves. A vacina demonstrou uma redução na colibacilose em 32%, na mortalidade em 51% e no IP, medido para celulite, em 60%.

Outro experimento realizado por Chansiripornchai (2009), tinha como objetivo avaliar a eficácia da vacina Poulvac *E. coli* contra a *E. coli* sorotipo O78, os resultados revelaram que a vacina tende a impedir a infecção por *E. coli*, sendo que, as aves do grupo vacinado apresentaram uma diminuição nos casos de aerossaculite, pericardite, perihepatite, peritonite e artrite quando comparado com o grupo não vacinado.

Em um estudo desenvolvido por Lynne *et al.* (2012), observou-se que o potencial de uma vacina baseada no gene que codifica a proteína Iss pode proporcionar uma proteção significativa contra o desafio a três cepas (sorogrupos) diferentes de *E. coli* a O1, O2 e O78.

2.1.4 Resistência antimicrobiana por *Escherichia coli*

A resistência aos fármacos antimicrobianos consiste na capacidade adquirida por microrganismos de resistir aos efeitos de um agente quimioterápico, ao qual ele é normalmente susceptível. Esta resistência aos antimicrobianos pode ser codificada geneticamente pelos microrganismos, quer pelo cromossomo bacteriano quer por um plasmídeo, denominado plasmídeo R (de resistência).

O uso indiscriminado e não medicinal dos antimicrobianos contribuiu para o surgimento de linhagens resistentes. Os antimicrobianos são utilizados na avicultura como suplementos de rações animais, tanto como substâncias promotoras de crescimento, como aditivos profiláticos para impedir a ocorrência de doenças, além de seu uso tradicional no tratamento de infecções. Em escala mundial, cerca de 50% de todos os antimicrobianos produzidos são utilizados com finalidades agropecuárias (MADIGAN, *et al.*, 2010).

A introdução de agentes antimicrobianos na ração comercial para bovinos, suínos e aves iniciou nos anos 1950, seguidamente estudos foram realizados com a finalidade de verificar os possíveis efeitos a longo prazo da utilização de agentes antimicrobianos (HAMMERUM & HEUER, 2009).

Desde então, vários experimentos tem sido feitos nessa área de pesquisa. Pode-se citar um estudo realizado em 2008 por Sjolund *et al.*, que verificaram dados de amostras de *E. coli* de aves oriundas do Ártico. O trabalho conclui que mesmo uma região de baixa pressão para a indução de resistência, pode-se encontrar uma multirresistência (14 dos 17 antimicrobianos utilizados) nas cepas de *Escherichia coli*, caracterizando um assunto complexo e que merece novos estudos para que seja melhor elucidado.

Segundo Gyles (2008), essa resistência mundial aos antimicrobianos pode ser constatada em dezenas de amostras de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*. O mesmo autor concluiu que a evolução das populações bacterianas tem uma relação direta com o aumento da resistência às drogas antimicrobianas, e esse processo de transmissão de resistência com o passar do tempo torna-se mais complexo. No que se refere especificamente as *Escherichia coli* comensais de animais, já é sabido que são

resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos comumente utilizados, como as tetraciclina, ampicilina e estreptomicina (KANG *et al.*, 2005).

Ao avaliar a suscetibilidade de 100 isolados de *Escherichia coli*, (originados de frangos de corte com sinais clínicos e lesões de colibacilose), a sete antimicrobianos, Aggad (2010), mostrou que os antibiogramas revelaram um alto nível de resistência à oxitetraciclina, trimetoprima-sulfametoxazol e enrofloxacina (87, 70 e 45%, respectivamente). Uma pequena porcentagem das amostras foram resistentes à gentamicina e nitrofurano (3 e 2%, respectivamente). Todas as cepas foram sensíveis à ampicilina. O autor relatou também que 72% dos isolados eram resistentes a pelo menos dois antimicrobianos e 45% eram resistentes a pelo menos três antimicrobianos.

Salle (2009), em sua tese de doutorado, pesquisou a resistência antimicrobiana de 246 amostras de *Escherichia coli* provenientes de cama de aviário, lesões de celulite e de lesões respiratórias de frangos de corte frente a 14 antimicrobianos, e observou-se que todas as amostras foram multirresistentes, ou seja, apresentaram resistência a mais de 2 das 14 drogas utilizadas.

Em um outro trabalho desenvolvido por Zakeri & Kashefi (2012), ao analisarem 100 amostras de *Escherichia coli* de origem aviária, provenientes de 50 propriedades, coletadas durante o período de 2008 a 2009, demonstram que a resistência antimicrobiana das amostras analisadas foi de 23% para enrofloxacina, 26% para cefalexina – sendo os antimicrobianos menos resistentes – e 100% para eritromicina, 99% para tetraciclina – antimicrobianos mais resistentes.

Em um estudo da resistência antimicrobiana em amostras de *E. coli* APEC provenientes de granjas comerciais de pequeno e grande porte de Bangladesh, realizado por Hasan *et al* (2011) constatou-se que das 101 amostras analisadas, mais de 55% foram resistentes a pelo menos um ou mais dos antimicrobianos testados, e 36,6% dos isolados apresentavam multirresistência. Ainda segundo os autores, a avicultura tem se desenvolvido muito nos últimos anos em Bangladesh, por isso, observou-se que o uso de antimicrobianos acaba sendo muito comum e nem sempre é prescrito por médicos veterinários.

Em experimento realizado por Costa *et al.* (2008), os autores demonstraram que a sequência de medicação utilizada em 16 mil frangos de corte, de diferentes antimicrobianos durante um curto período de tempo, com objetivos profiláticos, foi acompanhada de um aumento na taxa de resistência aos antimicrobianos e na diversidade fenotípica das amostras de *E. coli*.

Atualmente a resistência por *E. coli* a pelo menos duas classes de agentes antimicrobianos, é um achado comum, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, o que tem causado um crescente impacto no que seriam opções terapêuticas viáveis, além de ser considerado um dos problemas de saúde de maior relevância em nível mundial segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (BAUM, 2005; PONS *et al*, 2012).

Em 2006, foi realizado um trabalho com isolados de *Escherichia coli* a partir de fezes de frango e urina de pacientes hospitalizados, após análise dos resultados, observou-se as resistências de 82,4% e 43,8% respectivamente para o antimicrobiano tetraciclina. A alta na resistência frente a 11 antimicrobianos testados pode ter ocorrido porque, mesmo com fontes de coletas distintas e com porcentagens variadas, os genes associados às resistências a antimicrobianos foram similares. Tais resultados sugerem que esses genes estão disseminados no meio ambiente, necessitando maior investigação acerca das fontes aviárias como possíveis agentes causadores da resistência a tetraciclinas em humanos (MILES; MCLAUGHLIN; BROWN, 2006).

Os países desenvolvidos também estão contribuindo para o aumento na resistência aos antimicrobianos e isso pode ser percebido quando se observam dados como: nos Estados Unidos estima-se que 30% das prescrições de antimicrobianos para infecções de ouvido, 100% das prescrições para resfriado comum e 50% das prescrições para dores de garganta foram desnecessárias. Suspeita-se que pelo menos metade dos antimicrobianos produzidos nos Estados Unidos são erroneamente utilizados para estimular o crescimento animal (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Com o uso inapropriado de antimicrobianos juntamente com as falhas no monitoramento de resistência, praticamente todos os microrganismos patogênicos tendem a desenvolver resistência a alguns agentes quimioterápicos. (MADIGAN, *et al.*, 2010).

Atualmente vem sendo desenvolvido, no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (CDPA/UFRGS) um projeto de pós doutorado em parceria com a Faculdade de Medicina e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Este trabalho terá como objetivo traçar o perfil genético de amostras de *E. coli* oriundas de pacientes com infecção urinária através da detecção de fatores de virulência de 38 genes que determinam o potencial de patogenicidade, utilizando a técnica de Multiplex-PCR (m-PCR). Estes ensaios genéticos compreendem a expressão de fímbrias, produção de hemolisinas, aquisição de ferro, resistência ao soro, presença de toxinas entre outros. Os genes selecionados, e que fazem parte deste trabalho, codificam fatores de virulência e estão envolvidos nos mecanismos de patogenicidade de amostras de *E. coli*. Além disso, será

também analisado o perfil filogenético através de marcadores de patogenicidade utilizando uma PCR para grupos filogenéticos. Trata-se de um método simples e rápido que possibilita a detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TSPE4.C2 do referido patógeno (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Os resultados obtidos serão então analisados com a utilização de Redes Neurais Artificiais, (que tem como principais vantagens, a análise de dados qualitativos e quantitativos multivariados e não-lineares, o que é comum na área biológica), e relacionar estes com a patogenicidade observada em pintos de um dia de idade, estabelecendo relações entre os dados coletados na área avícola e os coletados na área humana. Espera-se, que as cepas do tipo UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica) e as cepas APEC possam mostrar características adaptativas em nichos distintos, e com isso, comprovar que essas cepas possam igualmente causar doenças extra-intestinais em humanos. Sugere-se que as cepas APEC's, servem como fonte ou como um reservatório de genes de virulência para ExPEC humana (*E. coli* extra-intestinal).

Segundo Manges & Johnson (2012), muitas das cepas ExPEC encontradas em humanos com infecções do trato urinário, septicemia e outras infecções extra-intestinais, principalmente as cepas altamente resistentes aos antimicrobianos, podem ser provenientes de uma fonte de alimento de origem animal, e podem ser transmitidas para os seres humanos através dos alimentos. Os autores citam ainda que, existe uma similaridade genética entre as cepas de APEC e ExPEC, que causam doenças em aves e humanos, respectivamente. Sendo que esta relação ainda é ressaltada pelos padrões de resistência e/ou genes de resistência observados tanto na APEC como na ExPEC.

2.2 Inteligência Artificial: Redes Neurais Artificiais (RNAs)

O termo inteligência artificial (IA) surgiu em 1956 a partir de uma reunião com cientistas de várias áreas do conhecimento, interessados na criação de máquinas inteligentes. A inteligência artificial é uma forma de simular a inteligência natural, deste modo, as redes neurais foram inspiradas na estrutura e na função de neurônios biológicos (ARTERO, 2009).

O sistema nervoso central contém mais de 100 bilhões de neurônios, o que possibilita a formação de uma rede muito complexa. Sinais aferentes chegam a esses neurônios por meio de sinapses localizadas principalmente nos dendritos neuronais. Para diferentes tipos de neurônios, podem existir desde algumas poucas centenas até cerca de 200.000 conexões sinápticas aferentes. Por sua vez, o sinal eferente desse mesmo neurônio trafega por axônio

único. O qual tem muitas ramificações distintas que se dirigem para outras regiões do sistema nervoso ou para a periferia do corpo (ARTERO, 2009; GUYTON; HALL, 2011).

Com o objetivo de simular o comportamento do neurônio biológico, McCulloch e WaterPitts (1943) propuseram o primeiro modelo de neurônio artificial com o trabalho publicado em 1943, “A logical Calculus of the Ideas Immament in Nervous Activity”. Este trabalho contribuiu para muitos dos teoremas fundamentais do estudo das redes neurais artificiais baseados no sistema nervoso, já que o mesmo se concentrou muito mais em descrever um modelo artificial de um neurônio e apresentar suas capacidades computacionais do que em apresentar técnicas de aprendizado (KÓVACS, 1996; BRAGA; CARVALHO; LUDEMIR, 2000; ARTERO, 2009; FACELI, *et al.*, 2011).

Outros pesquisadores deram importantes contribuições nos anos seguintes, dentre eles Hebb em 1949, propôs uma regra de aprendizagem que diz: quando um estímulo de entrada influencia na produção de estímulos de saída, o peso da conexão entre os neurônios deve ser incrementado. (FERNANDES, 2005),

Em meados de 1958, Rosenblatt descreveu o *perceptron* que foi um modelo computacional inspirado no neurônio humano e precursor das redes neurais artificiais. O *perceptron*, era composto de três camadas: a primeira – recebia as entradas do exterior e possuía conexões fixas (retina); a segunda – recebia impulsos da primeira através de conexões cuja eficiência de transmissão (peso) era ajustável e, por conseguinte, enviava saídas para a terceira camada (resposta). Ou seja, este modelo consistia de uma rede linear de neurônios organizados em um única camada, onde o vetor de entrada alimentava simultaneamente todos os neurônios. Assim sendo, o *perceptron* somente era capaz de classificar padrões que fossem linearmente separáveis (BRAGA; CARVALHO; LUDEMIR, 2000; FACELI, *et al.*, 2011).

No final da década de 60, Minsky e Papert, publicaram críticas ao *perceptron* que causou grande choque no meio científico. Essas críticas baseavam-se na impossibilidade de uma rede de um único nível, como o *perceptron*, aprender um padrão com variáveis não linearmente separáveis, como o de uma função lógica.

A partir da década de 80, houve uma nova explosão de interesse pelas RNAs na comunidade internacional. Este fato ocorreu principalmente com o avanço da tecnologia, o aparecimento de computadores mais rápidos, o interesse da construção de computadores paralelos e, principalmente, a proposta de novas arquiteturas de RNAs com maior capacidade de representação e de algoritmos de aprendizado mais sofisticados (BRAGA; CARVALHO; LUDEMIR, 2000; SILVA, 2002; ARTERO, 2009; FACELI, *et al.*, 2011).

Atualmente a rede neural artificial 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 (KÓVACS, 1996).

As redes neurais "aprendem" ajustando as interconexões dos pesos entre as camadas de neurônios. As respostas obtidas são, repetidamente, comparadas com as respostas corretas e, em cada vez, os pesos das conexões são ajustados ligeiramente na direção da resposta correta. São adicionados tantos neurônios ocultos quanto forem necessários para a maior precisão da resposta. A rede neural artificial é um conjunto de unidades processadoras que simulam os neurônios biológicos e são interconectados por um conjunto de pesos (análogo às conexões sinápticas no sistema nervoso), o qual permite tanto o processamento serial quanto paralelo de informações através da rede (SALLE, 2009).

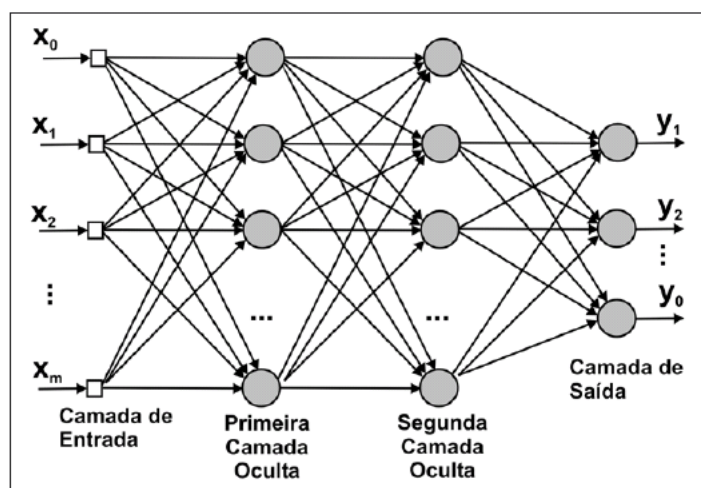


Figura 1: Exemplo de rede neural artificial.

Fonte: BARBOSA, *et al.*, 2005.

As RNAs exploram, simultaneamente, muitas hipóteses utilizando regras de aprendizagem que permitem adquirir poder de generalização suficiente para reconhecer padrões e prever cenários. Ou seja, após o treinamento da rede é realizada a generalização ou validação da rede que representa a capacidade de um modelo de aprendizado responder corretamente aos exemplos que lhes são apresentados, sendo que estes exemplos não devem estar presentes na base de aprendizado (HAYKIN, 1999; SILVA 2002).

As principais vantagens de utilização das redes são a tolerância a falhas, a aplicação em tempo real, a capacidade de auto adaptação e a rápida resolução de problemas práticos, sem necessidade de definição de listas de regras ou de modelos precisos (HAYKIN, 1999). As RNAs também possibilitam utilização de dados qualitativos e quantitativos no mesmo modelo, sem que haja a necessidade da transformação desses dados, para a estatística convencional, além de possibilitar a realização de análises de dados não lineares e multivariados, característica comum em fenômenos biológicos. (SALLE *et al.*, 2004).

As RNAs estão sendo utilizadas com vários objetivos, tais como: auxiliar os gestores de restaurantes universitários na previsão de refeições diárias (ROCHA; MATOS; FREI, 2011), bem como para resolver questões mais complexas, fazer prognóstico de mercados financeiros; reconhecer e gerar falas; localizar a origem de pontos no radar; otimizar processos químicos; reconhecer alvos e detectar minas bélicas; identificar células cancerosas; reconhecer anormalidades cromossômicas; prever trajetórias de entrada de naves espaciais; além de seu uso ser crescente em bancos, principalmente, quando se trata de cartões de crédito, mais especificamente, de comércio eletrônico (via internet), como meio de evitar fraudes eletrônicas nessas operações (CHENG & TITTERINGTON, 1994; O'SULLIVAN, 1999).

Os pesquisadores Terra & Passador (2012), realizaram um estudo com finalidade de avaliar a eficácia das RNA(s) na previsão da inflação, dentro da realidade de organizações de pequeno porte. Já na área da saúde, Tenório *et al.* (2011), desenvolveram um trabalho utilizando técnicas de inteligência artificial, aplicado ao desenvolvimento de um sistema de suporte de decisão, para diagnosticar a doença celíaca.

Com relação a área biológica as publicações com a utilização desta nova tecnologia vêm crescendo a cada ano. Na avicultura os primeiros modelos utilizando redes neurais artificiais foram publicados por Zhang *et al.* (1996) e Efadil *et al.* (1996). No Brasil as primeiras pesquisas onde foram utilizadas modelagens matemáticas, nesta área, foram publicadas por Salle *et al.* (1998) propondo a criação de um critério de interpretação para os resultados sorológicos, gerados pelas empresas avícolas, através de modelos matemáticos estatísticos. Salle *et al.* (1999) criou modelos matemáticos que foram utilizados para correlacionar a presença de aflatoxina e ocratoxina em alimentos e vísceras de frangos de corte com os parâmetros produtivos do lote. Estes trabalhos comprovaram a utilidade dos modelos matemáticos na área avícola e, assim sendo, iniciou-se a busca de uma metodologia capaz de solucionar problemas mais complexos.

Neste contexto as RNAs surgem como uma alternativa. Trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), têm demonstrado ótimos resultados, como já citados anteriormente.

Outros pesquisadores como Mottaghitlab *et al.* (2010) utilizaram as redes neurais artificiais na área da nutrição em experimento realizado com perus, o qual tinha como objetivo prever a conversão calórica e a eficiência alimentar, quando da utilização de rações contendo diferentes níveis de aminoácidos e energia. Observaram que os modelos melhoraram a capacidade de prever as características econômicas, bem como as necessidades de nutrição, levando a um ótimo desempenho na produção de aves.

Na área de produção animal as RNAs também vem sendo utilizadas, Savegnago *et al.* (2010), investigaram a possibilidade de utilizar as redes neurais em modelos de ajuste da curva de produção de ovos pela aplicação de duas abordagens de análise: uma utilizando um modelo não-linear logístico e outra com dois modelos de redes neurais artificiais, os resultados confirmaram que a rede neural MLP (*multilayer perceptron*) pode ser usada como uma ferramenta alternativa para ajustar a produção de ovos. Pode-se perceber que um dos benefícios da rede é a capacidade de generalização, além da possibilidade de aplicar esta técnica a qualquer conjunto de dados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas as informações disponíveis de 256 amostras de *E. coli* isoladas e identificadas bioquimicamente no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), de 60 diferentes propriedades de produtores integrados de três empresas avícolas do RS, as quais foram coletadas no verão e inverno de 2002.

As amostras foram isoladas de lesões de celulite, quadros respiratórios e cama aviário, e após determinação do Índice de Patogenicidade (IP) (SOUZA, 2006) foram preservadas no meio de cultura BHI (caldo cérebro coração) com glicerol em uma proporção de 4:1 a -80°C. Essas amostras fazem parte de um banco de dados do CDPA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As informações sobre as 256 amostras de *Escherichia coli* utilizadas para a formação das redes neurais artificiais seguem citadas a baixo:

- Características bioquímicas (adonitol, arginina, dulcitol, ornitina, rafinose, sacarose, salicina);
- Índice de patogenicidade (0 a 10);
- Lesões provocadas pela inoculação em pintos de um dia (celulite, peritonite, peri-hepatite, pericardite e aerossaculite);
- Caracterização de 38 genes associados a patogenicidade (*crl*, *ireA*, *cnf1/2*, *tia*, *sat*, *fyuA*, *mat*, *sfa/focCD*, *malX*, *afa/drab*, *neuC*, *iha*, *hrlA*, *fimC*, *pic*, *hlyA*, *kpsMTII*, *sitDep*, *ompA*, *iroN1*, *gimB*, *sitD*, *tratT*, *ibeA*, *chuA*, *vat*, *tsh*, *iucD*, *cvi/cva*, *papC*, *irp2*, *iss*, *EAST1*, *felA*, *iutA*, *cvaC*, *papG*, *fimH*);
- Resistência antimicrobiana a 14 antibióticos (amicacina, amoxicilina/ ácido clavulâmico, ampicilina, cefalexina, ceftiofur, cefuroxina, ciprofloxacina, clindamicina, cotrimoxazol, enrofloxacina, gentamicina, norfloxacina, ofloxacina e tetraciclina);
- Origem das amostras (cama de aviário, celulite e quadros respiratórios);
- Motilidade bacteriana.

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

Os resultados disponíveis dos bancos de dados foram classificados e identificados pelo software de forma binária e este critério foi utilizado para as classificações das amostras resistentes, intermediárias e sensíveis aos 14 antimicrobianos estudados. Partindo dessa premissa, juntamente com a escolha das variáveis que fizeram parte das redes sintetizadas, definiu-se como símbolo representativo para as amostras que não continham genes associados à patogenicidade, o número zero (0), e quando as amostras apresentavam genes associados à patogenicidade, atribui-se o número um (1). Essa padronização aplicou-se quando as seguintes variáveis foram analisadas: a ausência (0) ou presença (1) das distintas lesões observadas nos pintos de um dia de idade; e por fim, as amostras imóveis (0) e móveis (1).

As redes inicialmente encontraram relações lineares entre as variáveis envolvidas. O próprio software atribuiu pesos às ligações entre os “neurônios” de entrada e de saída baseando essa definição na análise do banco de dados importado para a própria composição da rede. Esse processo ocorre através das diferenças entre os valores desejados e os valores obtidos pelo processamento da rede. Esses valores obtidos são usados para alterar os valores dos pesos existentes nas entradas dos neurônios e, assim, a rede aprenderá o padrão apresentado (ARTERO, 2009).

O passo seguinte foi adicionar neurônios na camada oculta (no presente trabalho foram usadas 80 camadas) para que relações não lineares pudessem ser encontradas. As referidas camadas ocultas podem ser quantificadas pelo usuário do programa de redes neurais artificiais quando o mesmo (usuário) pode acessar a configuração do programa delimitando quantas camadas ocultas serão utilizadas na rede. Os valores de entrada na primeira camada foram multiplicados pelos pesos e passados para a segunda camada (oculta), e assim sucessivamente. Os neurônios da última camada oculta produziram valores que foram transmitidos para a camada de saída. Este resultado obtido na camada de saída foi comparado com o resultado real e, quando necessário, novas camadas ocultas foram adicionadas até a obtenção do resultado real, ou o mais próximo dele. Este procedimento se constituiu no “aprendizado” da rede neural artificial e a validação se deu com dados que a rede neural desconhecia, mas que estava apta a classificar corretamente.

No presente estudo, seguindo a metodologia utilizada por Salle (2009), as entradas escolhidas para a construção das redes neurais artificiais foram: os índices de patogenicidade, as lesões induzidas em pintos de um dia de idade, a caracterização dos genes associados à patogenicidade, o bioquimismo (utilizou-se nesse caso, somente os bioquímicos que

apresentavam variação comportamental: adonitol, arginina, dulcitol, ornitina, rafinose, salicina, sacarose), a origem das amostras e por fim, a motilidade. As redes neurais artificiais foram criadas realizando associações entre as variáveis de entrada (informações oriundas a partir dos bancos de dados do laboratório – CDPA), com o objetivo de encontrar o modelo mais ajustado. As saídas utilizadas foram o comportamento das cepas de *Escherichia coli* frente aos 14 antimicrobianos.

As figuras a seguir retratam a interface do programa computacional de redes neurais artificiais, exemplificando algumas saídas (cotrimoxazol e clindamicina) que foram utilizadas no presente estudo. O respectivo programa possibilitou realizar a predição das resistências das amostras aos antimicrobianos selecionados, definindo individualmente a probabilidade de cada antimicrobiano ser, resistente, sensível ou intermediário, além de fornecer dados como a sensibilidade e especificidade das amostras.

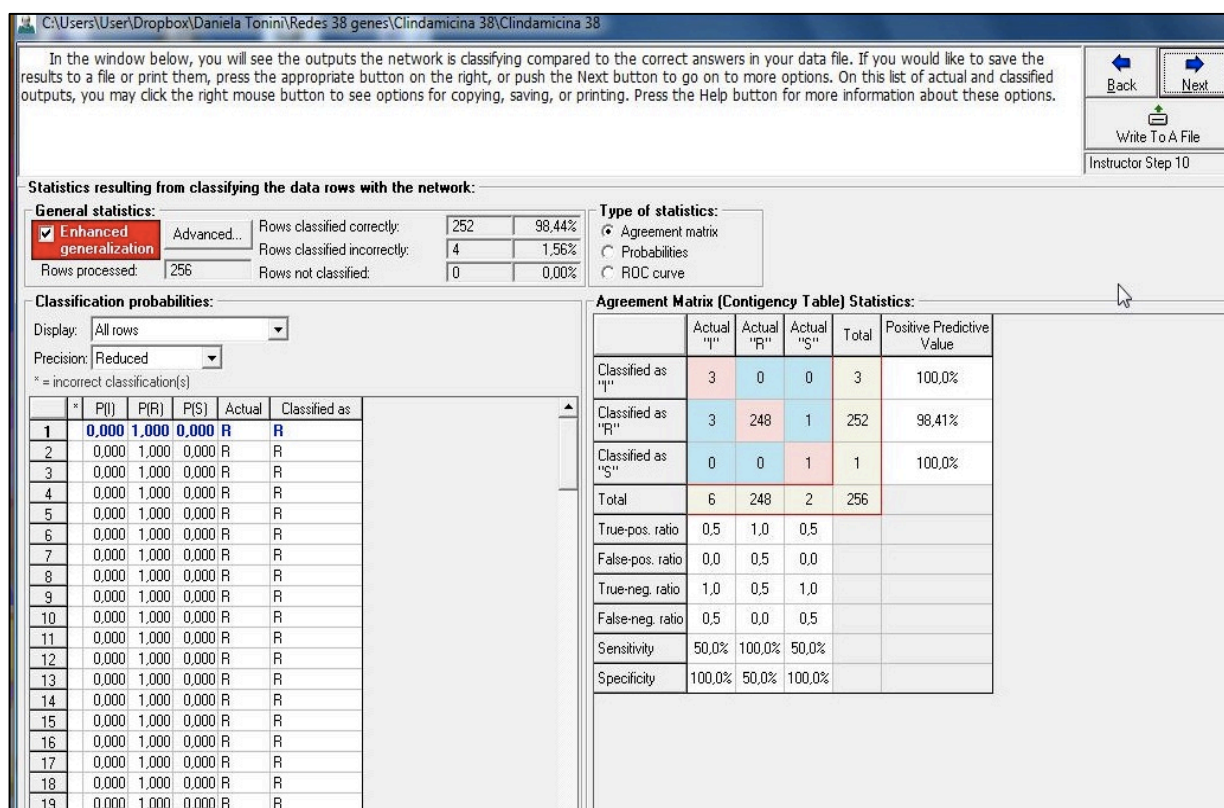


Figura 2: Layout do programa de redes neurais artificiais – saída selecionada: o antimicrobiano clindamicina

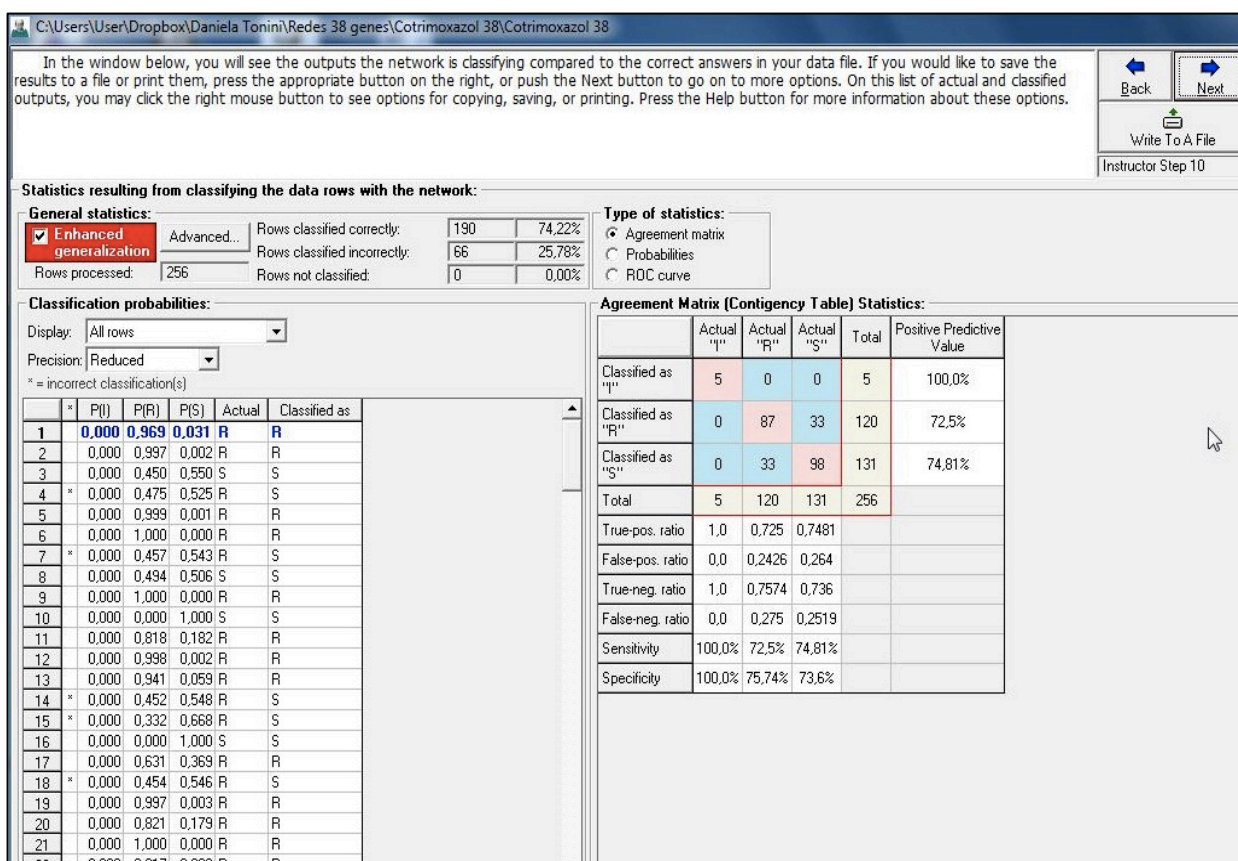


Figura 3: Layout do programa de redes neurais artificiais – saída selecionada: o antimicrobiano cotrimoxazol.

A diferença significativa entre as médias dos índices de patogenicidade e as amostras sensíveis e resistentes aos 14 antimicrobianos utilizados neste estudo foi observada quando realizou-se a análise estatística com o auxílio do software JMP® 9.0.1 (SAS Institute Inc., 2010), especificamente utilizando análise de variância (ANOVA), método empregado para se testar a igualdade de três ou mais médias populacionais através da análise das variâncias amostrais (TRIOLA, 2008), e o teste de Tukey.

4 RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentadas as características das redes neurais artificiais construídas utilizando como entradas 38 genes associados a virulência. As saídas são as resistência ou sensibilidade aos 14 antimicrobianos estudados por Salle (2009). A sensibilidade (S) e especificidade (E) das amostras intermediária (i), resistente (r) e sensível (s) também podem ser observadas na mesma tabela.

Tabela 1 - Classificação da resistência bacteriana (intermediária, resistente ou sensível) de 256 amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte frente a 14 antimicrobianos através do uso de redes neurais artificiais, usando como entrada os 38 genes associados a virulência.

Saídas	Entrada	Classificações corretas (%)	S (i)*	E (i)	S (r)	E (r)	S (s)	E (s)
Amicacina	Genes	97,27	0,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0
Amoxicilina + Ac. Clavulânico	Genes	98,05	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,37
Ampicilina	Genes	82,42	0,72	1,0	0,36	0,98	0,98	0,41
Cefalexina	Genes	94,92	0,6	1,0	0,41	0,99	0,99	0,5
Ceftiofur	Genes	96,88	0,57	1,0	0,71	1,0	1,0	0,61
Cefuroxima	Genes	96,09	0,0	1,0	0,28	1,0	1,0	0,16
Ciprofloxacina	Genes	85,94	0,75	1,0	0,55	0,97	0,97	0,61
Clindamicina	Genes	98,44	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0
Cotrimoxazol	Genes	74,22	1,0	1,0	0,72	0,75	0,74	0,73
Enrofloxacina	Genes	75,78	0,42	0,98	0,53	0,94	0,94	0,55
Gentamicina	Genes	88,67	-	-	0,35	0,99	0,99	0,35
Norfloxacina	Genes	88,28	0,55	1,0	0,34	1,0	1,0	0,42
Ofloxacina	Genes	89,45	1,0	1,0	0,24	0,99	0,99	0,5
Tetraciclina	Genes	77,73	1,0	1,0	0,87	0,63	0,62	0,87

* S (i): sensibilidade para amostras com resistência intermediária;

E (i): especificidade para amostras com resistência intermediária

S (r): sensibilidade para amostras resistentes;

E (r): especificidade para amostras resistentes;

S (s): sensibilidade para amostras sensíveis;

E (s): especificidade para amostras sensíveis.

De acordo com os resultados da tabela acima, observa-se que as classificações corretas tiveram uma amplitude de 74,22% a 98,44%. Já com relação a sensibilidades e especificidades das classificações, os resultados mostraram que a amplitude das sensibilidades das classificações foi de 0% a 100% para as amostras intermediárias, 0% a 87% para as resistentes e 62% a 100% para as sensíveis. Referindo-se às especificidades, os resultados foram de 98% a 100% para as amostras intermediárias, 50% a 99% para as resistentes e 0% a

87% para as sensíveis.

Os resultados obtidos a partir da análise estatística do índice de patogenicidade e dos 14 antimicrobianos analisados neste estudo, demonstraram que não há diferenças significativas entre as médias do IP e a resistência antimicrobiana das amostras, conforme observa-se na tabela 2.

Tabela 2 – Antimicrobiano e sua média do índice de patogenicidade (IP)

Antimicrobiano	Média de IP
Amicacina I *	4.6666667 a**
Amicacina R	3.2500000 a
Amicacina S	4.2570281 a
Amoxicilina + Ac. Clavulânico I	4.6000000 a
Amoxicilina + Ac. Clavulânico R	1.0000000 a
Amoxicilina + Ac. Clavulânico S	4.2782258 a
Ampicilina I	1.7272727 a
Ampicilina R	4.4603175 a
Ampicilina S	4.3241758 a
Cefalexina I	3.0000000 a
Cefalexina R	3.6470588 a
Cefalexina S	4.3162393 a
Ceftiofur I	3.6428571 a
Ceftiofur R	5.1428571 a
Ceftiofur S	4.2553191 a
Cefuroxima I	3.2000000 a
Cefuroxima R	5.7142857 a
Cefuroxima S	4.2254098 a
Ciprofloxacina I	2.9500000 a
Ciprofloxacina R	3.9500000 a
Ciprofloxacina S	4.4943182 a
Clindamicina I	2.1666667 a
Clindamicina R	4.2580645 a
Clindamicina S	9.0000000 a
Cotrimoxazol I	5.8000000 a
Cotrimoxazol R	4.6166667 a
Cotrimoxazol S	3.8473282 a
Enrofloxacina I	4.0952381 a
Enrofloxacina R	4.0000000 a
Enrofloxacina S	4.3907285 a
Gentamicina R	4.8571429 a
Gentamicina S	4.1261682 a
Norfloxacina I	3.9500000 a
Norfloxacina R	4.1562500 a
Norfloxacina S	4.2892157 a
Ofloxacina I	3.6666667 a
Ofloxacina R	4.4242424 a
Ofloxacina S	4.2682927 a
Tetraciclina I	6.3333333 a
Tetraciclina R	4.2838710 a
Tetraciclina S	4.1224490 a

* I : amostras intermediárias, R: amostras resistentes, S: amostras sensíveis.

** a : a letra “a” é uma forma simplificada de ilustrar que não existem diferenças significativas entre resistência e sensibilidade dos diferentes antimicrobianos e a média do IP.

Na tabela 2 estão descritos todos os antimicrobianos utilizados neste estudo e suas respectivas médias do índice de patogenicidade (IP). Assim sendo, níveis que se conectam por uma mesma letra não são significativamente diferentes.

5 DISCUSSÃO

A resistência aos fármacos antimicrobianos é um dos principais problemas em relação a muitos microrganismos patogênicos. O uso extensivo de agentes antimicrobianos na medicina, veterinária e agricultura propicia condições altamente seletivas para a disseminação de plasmídeos R. Os plasmídeos R e outras fontes de genes de resistência constituem-se em limitações significativas ao uso por um longo prazo de qualquer antimicrobiano como agente quimioterápico eficaz. São cada vez maiores os índices de resistência das bactérias frente aos antimicrobianos testados, representando um sério problema mundial. Amostras de *E. coli* isoladas de aves são frequentemente resistente a mais de uma droga (ZANATA *et al.*, 2004; MADIGAN *et al.*, 2010).

Inúmeros trabalhos relatam a questão de resistência antimicrobiana por amostras de *E.coli* APEC. Entre eles, um experimento realizado em Bangladesh onde 50 isolados de *E.coli*, provenientes de suabe cloacal, fluido intestinal, superfície de ovos, material fecal e lavagem das mãos de manipuladores de frango, foram identificados e submetidos a 13 antimicrobianos para verificar a sua susceptibilidade. Todas as amostras testadas apresentaram multirresistência variando de 6 a 10 das 13 drogas utilizadas (AKOND *et al.*, 2009).

Em um outro trabalho desenvolvido por Wang *et al.* (2010), foram analisadas 148 amostras de *Escherichia coli* de origem aviária, coletadas durante o período de 2005 a 2008 e os resultados também apresentaram multirresistência.

O presente estudo aborda o assunto resistência a antimicrobianos de amostras de *E.coli* (APEC) de uma forma inovadora, utilizando como ferramenta as redes neurais artificiais, metodologia inserida na linha de pesquisa do CDPA – modelos matemáticos na avicultura.

As RNAs vêm sendo utilizadas em diversas áreas incluindo a agropecuária, bioinformática, robótica, saúde, finanças entre outras. Este fato se comprova nos inúmeros artigos publicados utilizando esta ferramenta.

Com relação a sanidade avícola, esta nova metodologia também tem merecido destaque, fato este confirmado através dos trabalhos apresentados e publicados no “60th Western Poultry Disease Conference” em 2011 pelos pesquisadores do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA).

Este estudo compartilha das conclusões obtidas por Salle *et al.* (2011), e ainda faz uma releitura traçando um paralelo entre trabalhos, demonstrando que é possível, de uma forma

mais simplificada, utilizar somente os 38 genes associados a virulência para obter resultados conclusivos quanto a resistência antimicrobiana. Os resultados das classificações corretas ficaram tão bons quanto o estudo anterior, ficando acima de 80% para a maioria dos antimicrobianos, sendo que apenas 3 antimicrobianos apresentaram modelos menos ajustados, porém ainda bons, com correlações corretas acima de 70%. Ao serem analisadas as sensibilidades das classificações a amplitude foi de 0% a 100% para as amostras intermediárias, 0% a 87% para as resistentes e 62% a 100% para as sensíveis. Quanto às especificidades, os resultados foram de 98% a 100% para as amostras intermediárias, 50% a 99% para as resistentes e 0% a 87% para as sensíveis.

Como o IP e a resistência antimicrobiana são preditos ou classificados a partir de um mesmo conjunto de dados, ou seja, os 38 genes associados a virulência, poderia haver uma relação entre os dois. Através dos resultados obtidos pela análise estatística pode-se observar que estas são variáveis independentes, ou seja, podem haver picos no IP sem alteração na resistência antimicrobiana, ou até mesmo o contrário, alterações na resistência antimicrobiana sem mudanças no IP.

No trabalho realizado por Salle *et al.* (2011), as redes neurais foram capazes de realizar a classificação correta do comportamento das amostras com amplitude de 90,24% a 100%. Entre os resultados obtidos no experimento, observou-se que as classificações corretas tiveram uma amplitude variando de 74,22% a 98,44%.

Após a realização completa da metodologia e a análise dos dados quantitativos e qualitativos via redes neurais artificiais (inteligência artificial) e estatística convencional, o presente trabalho demonstrou que utilizando somente 38 genes associados à virulência, pode-se prever qual antimicrobiano deve ser administrado no tratamento contra 256 amostras de *Escherichia coli* oriundas de frango de corte.

Salienta-se que muitas vezes as amostras, recebidas no laboratório, não possuem muitas informações, que até então seriam cruciais para a formação da rede. No presente trabalho foi demonstrado que se há suspeita de infecção por *Escherichia coli*, pode-se isolar o agente, realizar uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e, depois disto, descobrir quais são os genes associados à virulência, determinando através das Redes Neurais Artificiais (RNAs) qual seria o melhor tratamento para esta nova amostra.

Desta forma, para o profissional (médico veterinário) que está trabalhando no campo, estas informações se constituem em uma arma valiosa, pois através dessa ferramenta, juntamente com o teste molecular da PCR para obter informações sobre quais são os genes presentes nas amostras enviadas ao laboratório, pode ser decidido qual o tratamento mais

indicado para aquele isolado de *Escherichia coli* que está acometendo o plantel, conseguindo agilizar de forma significativa a emissão de laudos e por conseguinte, o tratamento frente a esse patógeno passa a ser mais ágil e preciso.

6 CONCLUSÕES

1. Utilizando somente os 38 genes associados a virulência, é possível prever a resistência antimicrobiana da *Escherichia coli*, através de modelo das RNAs.
2. Não há diferenças significativas entre as médias dos índices de patogenicidade (IP) e os antimicrobianos analisados. Ou seja, a resistência ou sensibilidade de uma determinada amostra de *E. coli* independem do IP; logo, amostras podem ser apatogênicas e resistentes a determinado(s) antimicrobiano(s) e, o contrário também pode ser verificado, amostras podem ser patogênicas e ao mesmo tempo sensíveis a determinado(s) antimicrobiano(s).

7 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGAD, H., *et al.*. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from chickens with colibacillosis. **Global Veterinaria**, 2010.

Disponível em: <[http://idosi.org/gv/gv4\(3\)10/17.pdf](http://idosi.org/gv/gv4(3)10/17.pdf)>. Acesso em: 16 mar. 2012.

ANDREATTI FILHO, R. L. (Org). Colibacilose Aviária. In: **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Rocca, 2006.

ANTÃO, E.M., WIELER, L. H.; EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**. v.1, 2009.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797515/pdf/1757-4749-1-22.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2012.

AKOND, M.A. *et al.* Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. **Internet Journal of Food Safety**, v. 11, 2009. p. 19-23.

ARTERO, A.O. **Inteligência artificial teórica e prática**. São Paulo: Livraria da Física, 2009.

ARRECUBIETA, C. *et al.* The transport of group 2 capsular polysaccharides across the periplasmic space in *Escherichia coli* roles for the *KpsE* and *KpsD* proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, 2001.

Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/276/6/4245.full.pdf>> Acesso em: 26 abr. 2012.

ASSIS, A. C. B. & SANTOS, B. M. Patogenicidade In Vivo e In Vitro de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 3, n.2, 2005.

BACK, Alberto. **Manual de doenças das aves**. Cascavel: Integração, 2010.

BARBOSA *et al.*. Confiabilidade estrutural utilizando o método de Monte Carlo e redes neurais. **Rev. Esc. Minas**, v. 58, n.3, 2005.

BARNES, H. J.; NOLAN, L.K.; VAILLANCOURT, J-P. Colibacillosis. In: **Diseases of Poultry**. 12th ed. Ed. Calnek, B. D. Ames: University Press, 2008. p. 691-737.

BAUM, V, H; MARRE, R; Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* and Therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**.v.295, 2005. p. 503-511.

BRAGA, A. de P.; CARVALHO, A. P. de L. F.; LUDERMIR, T. B. **Redes Neurais Artificiais, Teoria e Aplicações**. Rio de Janeiro: Ed. LTC, 2000.

BRITO *et al.*, Celulite cervical em frangos de corte causada por *Escherichia coli*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, 2002. p. 81-84.

CHANSIRIPORNCHAI, V. R. N. The Efficacy of *Escherichia coli* AroA-Live Vaccine in Broilers against Avian *E. coli* Serotype O78 Infection, **Thai J. Vet. Med.**, v. 39, n. 4, 2009. p. 337 – 342.

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

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.10, 2000. p. 4555 – 4558.

COSTA, P.M. *et al.* Effects of antimicrobial treatment on selection of resistant *Escherichia coli* in broiler fecal flora. **Microb. Drug Resist.**, v. 14, n. 4, 2008. p. 299-306.

DAM, T.; DAS, P. Plasmids – potential tool for the investigation of gene transfer in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 4, 2006. p. 479-480.

DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, 30: 299-316, 1999.

DOBRINDT *et al.* Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 5, 2004. p. 414 – 424.

DZIVA, F.; STEVENS, M.P. Colibacillosis in poultry: unraveling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian pathology**. v. 37, n. 4, 2008. p. 355 – 366.

ELFADIL, A. A. *et al.* Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. **Avian Dis**. v. 40, n. 3, 1996. p.690-698.

EWERS, C. *et al.* Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? ***International Journal of Medical Microbiology***, v. 297, n. 3, 2007.

FACELI, K. *et al.* **Inteligência artificial uma abordagem de aprendizado de máquina**. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

FERNANDES, A.M.R. **Inteligência artificial**. Florianópolis: VisualBooks, 2005.

FERREIRA, A. J. P. & KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JÚNIOR, Ângelo *et al.* **Doenças das Aves**. Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 2009.

GYLES, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. ***Anim Health Res. Rev.***, v. 9, n. 2, 2008. p. 149-158.

GYLES, C. L. Relevance in pathogenesis research. ***Veterinary Microbiology***, v. 153, n. 1-2, 2011. p. 2-12.

GREGERSEN, R. H. *et al.* Impact of *Escherichia coli* vaccine on parent stock mortality, first week mortality of broilers and population diversity of *E. coli* in vaccinated flocks. ***Avian Pathology***, v. 39, n. 4, 2010. p. 287-295.

GROSS, W.G. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: ***Escherichia coli in domestic animals and humans***. Ed. Gyles, C. L. Guelph: CabInternational, 1994. p. 237-259.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Organização do sistema nervoso central, funções básicas das sinapses e neurotransmissores. In: **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. ***Annual Review of Microbiology***, v. 54, 2000. p. 641-679.

HAYKIN, S. **Redes Neurais, Princípios e Prática**. 2.ed. Porto Alegre: Bookman, 1999.

HAMMERUM, A.M.; HEUER, O.E. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. ***Clin Infect Dis***, v. 48, n. 7, 2009. p. 916-921.

HASAN, B. *et al.* High prevalence of antibiotic resistance in pathogenic *Escherichia coli* from large and small scale poultry farms in Bangladesh. **Avian Diseases**, v. 55, n. 4, 2011. p. 689-692.

KABIR, S.M.L. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. **Int. Environ. Res. Health**. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2819778/pdf/ijerph-07-00089.pdf> >. Acesso em: 10 jan. 2012.

KANG, H.Y. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 55, n. 5, 2005. p. 639-644.

KARIYAWASAM S.; NOLAN, L.K. papA gene of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 55, n. 4, 2011. p. 532-538.

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, 2000. p. 107-117.

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

LYNNE, A. M. *et al.* Recombinant Iss as a Potential Vaccine for Avian Colibacillosis. **Avian Diseases**, v. 56, n. 1, 2012. p. 192-199.

MADIGAN, M.T., *et al.* **Microbiologia de brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MANGES, A.R.; JOHNSON, J. R. Food-Borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 5, 2012. p. 712 – 719.

MILES, T. D.; MCLAUGHLIN, W.; BROW, P. D. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 7, 2006.

MELLATA, M. *et al.* Role of virulence in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and pathogenicity. **Infection and immunity**, Washington, v. 71, n. 1, 2003. p. 536-540.

MOTTAGHITALAB, M. *et al.* Predicting caloric and feed efficiency in turkeys using the group method of data handling-type neural networks. **Poultry Science**, v. 89, n. 6, 2010. p. 1325-1331.

NOLAN, L. K. *et al.* Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 3, 2003. P. 101 – 110.

NORTON, R. A.; BILIGILI, S. F.; MCMURTREY, B. C. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. **Avian Diseases**. v. 41, n.2, 1997. p.422-428.

OLIVEIRA, S.J. **Guia bacteriológico prático**. Canoas: ULBRA, 260p. 2012.

OLKOWSKI A. A. *et al.* The role of first line of defence mechanisms in the pathogenesis of cellulitis in broiler chickens: skin structural, physiological and cellular response factors. **J. Vet. Med. A**. v. 52, n. 10, 2005. p. 517-524.

O'SULLIVAN, O. Who's that knocking on my portal? **USBanker**, New York, v. 109, n. 11, 1999. p.

PONS, M.J. *et al.* Niveles de Resistencia a antimicrobianos, en especial a quinolonas, en cepas de *Escherichia coli* comensales en niños de la zona periurbana de Lima, Perú. **Rev. Peru Med Exp. Salud Publica**. v. 29, n. 1, 2012.

Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/rpmesp/v29n1/a12v29n1.pdf>>

Acesso em: 17 jul. 2012.

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ROCHA, A.C.G.P. *et al.* Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. **Pesq. Vet. Bras**. v. 28. n. 3. 2008.

ROCHA, J.C; MATOS, F.D; FREI, F. Utilização de redes neurais artificiais para a determinação do número de refeições diárias de um restaurante universitário. **Revista de nutrição**, Campinas, v. 24, n. 5, 2011. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732011000500007&script=sci_arttext> .

Acesso em: 04 de abr. 2012.

SALLE, C.T.P. *et al.* 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. 2004.

SALLE, C. T. P. *et al.*. Use of statistical technique on the interpretation of routine serologic data produced by poultry industry. In: **Asia-Pacific Poultry Health Conference**, 47., 1998, Melbourne - Australia. Abstracts. Melbourne: Australian Veterinary Poultry Association, p.148, 1998.

SALLE, C. T. P. *et al.*. Correlation between aflatoxin and ocratoxin levels with production parameters in a poultry company. In: **Western Poultry Disease Conference**, 48., 1999, Vancouver - Canada. Abstracts. Vancouver: American Association of Avian Pathologists (AAAP), p.130, 1999.

SALLE, F. O. **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.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009.

SALLE, F.O. *et al.* **Use of artificial intelligence (artificial neural networks) to classify antimicrobial resistance from *Escherichia coli* samples isolated from broilers.** In: 60th Western Poultry Disease Conference, 2011, Sacramento. Proceedings 60th Western Poultry Disease Conference, 2011.

SAVEGNAGO, R.P. *et al.* Comparison of logistic and neural network models to fit to the egg production curve of white leghorn hens. **Poultry Science**, v. 90, n.3, 2010.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, 2004.

SHANE, S.M. Reducing pathogenic *E. coli* infection by vaccination. **World Poultry**, v. 25, n. 5, 2009.

SILVA, Alexandre Bandeira Monteiro e. **Redes neurais artificiais, análise de sensibilidade e o comportamento de funções de comércio exterior do Brasil.** 2002. Tese (Doutorado na área de Economia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SILVA, I.M.M *et al.* Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, n. 2, 2011. p. 333-339.

SJOLUND, M. *et al.* Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. **Emerg.Infect.Dis.**, v. 14, n. 1, 2008. p. 70-72.

SOUZA, F.G. **Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frango de corte**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

TENÓRIO, M. J. *et al.* Artificial intelligence techniques applied to the development of a decision–support system for diagnosing celiac disease. **International Journal of Medical Informatics**, v. 80, n. 11, p. 793-802, 2011.

TERRA, L. A. A; PASSADOR, J. L. Redes neurais artificiais na previsão da inflação: aplicação como ferramenta de apoio à análise de decisões financeiras em organizações de pequeno porte. **RAM, Rev. ADM. Mackenzie**, v. 13, n. 1, p. 68-86, 2012.

TORTORA, Gerard J; FUNKE, Berdell R.; CASE Christine L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L.R; ORDOÑEZ, J.G.; MARTINEZ, M.B. *Enterobacteriaceae*. In: **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 10 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

WANG, X.M. *et al.* Prevalence of serogroups, virulence genotypes, antimicrobial resistance, and phylogenetic background of avian pathogenic *Escherichia coli* in South of China. **Food borne pathogens and disease**. v. 7, n. 9, 2010.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual**, 2012. Disponível em <www.abef.com.br>. Acesso em: Abr. 2012.

VIEIRA, T. B. *et al.* Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 13, n. 3, 2006. p. 174-177.

ZANATA, G.F., *et al.* Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.71, n.3, p.283-286.

ZHANG, Z. *et al.* A simple model for predicting the response of chicks to dietary enzyme supplementation. **J. Anim. Sci.**, v.74, n. 2, 1996. p.394-402.

ZAKERI, A.; KASHEFI, P. Antimicrobial susceptibilities of avian *Escherichia coli* isolates in Tabriz, Iran. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 19, 2012. p. 4467-4470.