

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

**USO DE REDES NEURAS ARTIFICIAIS PARA CLASSIFICAÇÃO DA
PATOGENICIDADE DE *Escherichia coli* DE ORIGEM AVIÁRIA**

Dissertação de Mestrado

Thiago Moreira Tejkowski

PORTO ALEGRE

2013

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

**USO DE REDES NEURAS ARTIFICIAIS PARA CLASSIFICAÇÃO DA
PATOGENICIDADE DE *Escherichia coli* DE ORIGEM AVIÁRIA**

Autor: Thiago Moreira Tejkowski

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva, na especialidade de Sanidade Avícola.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

PORTO ALEGRE

2013

Thiago Moreira Tejkowski

**USO DE REDES NEURAS ARTIFICIAIS PARA CLASSIFICAÇÃO DA
PATOGENICIDADE DE *Escherichia coli* DE ORIGEM AVIÁRIA**

Aprovado em:

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Prof. Dr. Guilherme Fonseca de Souza
Membro da Comissão

Prof. Dr. Benito Guimarães de Brito
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

*Dedico essa dissertação
aos meus pais Marislei Moreira
e Lidio Adão Tejkowski;
e a minha amiga Maiara Moraes;
que tanto me apoiaram!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lidio Adão Tejkowski e Marislei Moreira, os quais sempre acreditaram no meu sucesso. Amo vocês!

Ao Professor Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle, meu orientador no mestrado e ao Professor Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes. Obrigado pelas dicas e pelos muitos ensinamentos, permitindo meu amadurecimento acadêmico e profissional.

Ao Dr. Benito Guimarães de Brito, pesquisador do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor. Obrigado pelos momentos convividos e pelas amostras bacterianas cedidas para realização deste estudo.

A Dr^a Fabiana Horn do Departamento de Biofísica da UFRGS. Obrigado pela confiança nos trabalhos realizados e por ceder às amostras de *E. coli* que foram utilizadas como controles positivos nos ensaios de PCR..

Ao Dr. Guilherme Souza e a Dr^a. Diana Giotto pelo apoio e incentivo na seleção de mestrado.

Aos funcionários do CDPA, especialmente ao Silvio Luis da Silveira Rocha, pelos momentos de conversas, reflexões e dúvidas referentes ao trabalho.

Aos meus amigos que durante esta caminhada sempre me incentivaram a nunca desistir: Rita Cássia, Elisar Camilotti, Felipe Cardinal, Joaquim Cardinal, André Bizzi, entre outros que estiveram presentes.

Aos meus irmãos de coração que fiz nesses três anos de caminhada: Daiane Carvalho, Gustavo Perdoncini e Gabriela Zottis. Sem vocês seria muito mais difícil!

A minha amiga Maiara Moraes! Seu apoio foi incrível, se hoje estou aqui, tudo dependeu do seu incentivo desde o início. Sou eternamente grato a sua amizade, seu carinho e seu respeito.

A todas as pessoas que por algum momento estiveram comigo nesse período de estudos.

Muito obrigado!

*O segredo da felicidade esta em olhar
todas as maravilhas do mundo e nunca
se esquecer da sua missão ou objetivo.*

(Paulo Coelho)

RESUMO

E. coli Patogênicas Aviárias (APEC) são uma das causas de doenças extra-intestinais em aves, as quais trazem grande prejuízo econômico para o setor avícola mundial. Os avanços nas pesquisas vêm aumentando o entendimento dos mecanismos de patogenicidade das APEC, demonstrando a grande importância da interação dos diversos fatores de virulência na determinação da sua patogenicidade. Redes Neurais Artificiais (RNAs) têm mostrado ser uma poderosa ferramenta para uma vasta gama de aplicações. Neste trabalho, o foco na aplicação da RNA é na predição (0 a 10) da patogenicidade de amostras APEC. Em 489 isolados APEC foram analisados a presença de 38 genes associados a virulência, o Índice de Patogenicidade (IP) *in vivo* e a motilidade das amostras. Duas RNAs foram construídas utilizando o software Neuroshell Classifier 2.1 (Ward Systems Group, Inc., Frederick, MD, USA) em duas fases distintas: treinamento e validação. Utilizou-se como camada de entrada, informações sobre a presença ou ausência dos 38 genes de virulência e a motilidade de cada uma das amostras, com uma camada de saída formada pelo IP *in vivo* previamente determinado. As RNAs construídas apresentaram uma classificação correta acima de 90%, sendo que a rede 1 apresentou uma classificação de 91,62 e a rede 2 de 99,03%. A rede 2 obteve uma especificidade superior a 99,64% em todas as categorias e uma sensibilidade superior a 92,86%. Isso demonstra que o método aqui proposto, revelou ser uma ótima ferramenta de suporte às decisões de médico veterinário, descartando no futuro a inoculação de animais.

Palavras chave: Patogenicidade; *Escherichia coli* Patogênica Aviária; Redes Neurais Artificiais;

ABSTRACT

Avian Pathogenic Escherichia coli (APEC) are one of the causes of extraintestinal diseases in birds, and cause considerable economic losses to the poultry industry worldwide. Advances in research have increased understanding of pathogenic mechanisms of APEC, and have demonstrated the importance of the interaction of several virulence factors in determining their pathogenicity. Artificial Neural Networks (ANN) have shown to be a powerful tool for a wide range of applications. In this paper, the focus on neural network applications in the prediction (index of 0-10) of the pathogenicity of isolates APEC. In 489 APEC isolates were analyzed: 38 virulence-associated genes, the Pathogenicity Index (PI) in vivo and motility of the strains. Two ANNs were constructed using the software Neuroshell Classifier 2.1 (Ward Systems Group, Inc., Frederick, MD, USA) in two distinct phases: training and validation. We used as input layer, information about the presence or absence of the 38 virulence-associated genes and the motility of each of the samples, with an output layer formed by a previously-determined PI in vivo. The ANNs showed a correct classification of the PI above of 90%, being that the network 1 had a rating of 91.62% and the network 2 of 99.03%. The network 2 obtained a specificity of over 99.64% and sensitivity greater than 92.86% in all categories. This demonstrates that the method proposed here has proven to be a great decision support tool for the veterinarian, thereby dispensing the inoculation of animals in the future.

Key words: *Pathogenicity; Avian Pathogenic Escherichia coli; Artificial Neural Networks.*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Número e percentual da motilidade das amostras de <i>E. coli</i> conforme seu IP (Índice de Patogenicidade <i>in vivo</i> em pintos).....	39
TABELA 2	Frequência dos genes associados à virulência encontrados nas 489 amostras de <i>E. coli</i> isolada de aves	41
TABELA 3	Porcentagem das amostras albergando ambos os genes (489 <i>E. coli</i>).....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Esquema de um neurônio matemático	29
FIGURA 2 Estrutura das Redes Neurais Artificiais deste estudo	37
FIGURA 3 Colônias de <i>E. coli</i> no Ágar MacConkey (A) e teste de motilidade no meio de cultura SIM (B)	38
FIGURA 4 Figura 4 – Produtos de amplificação de quatro ensaios multiplex-PCR (MP1/MP2/MP3/MP4), amplificados separadamente usando conjunto de <i>primers</i>	39
FIGURA 5 Produtos de amplificação de um ensaio de multiplex-PCR (MP5), amplificados separadamente usando conjunto de <i>primers</i>	40
FIGURA 6 Produtos de amplificação de um ensaio de multiplex-PCR (MP6), amplificados separadamente usando conjunto de <i>primers</i>	40
FIGURA 7 Resultados apresentados pela “rede A”	44
FIGURA 8 Resultados apresentados pela “rede B”	45

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 Frequência absoluta das 489 amostras nos diferentes IP (*in vivo*)..... **42**

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celcius
cm ²	Centímetros quadrado
%	Porcento
µL	Microlitro
µm	Micrometro
mm	Milímetro
mM	Micromolar
®	Marca registrada
Σ	Soma
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
10X	Dez vezes
pmol	Picomol
pb	Pares de base
A	Aerossaculite
Antígeno H	Antígenos flagelares
Antígeno K	Antígenos capsulares
Antígeno O	Antígenos somáticos
Antígeno P	Antígenos fimbriais
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C	Celulite
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DRCC	Doença Respiratória Crônica Complicada
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica

ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extra-intestinal
FBS	Fator de Bonificação de Sobrevivência
FEPAGRO	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IA	Inteligência Artificial
IP	Índice de Patogenicidade
IPI	Índice de Patogenicidade Individual
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
mL	Mililitro
N	Número de pintinhos inoculados
NMEC	<i>E. coli</i> associada a meningite do recém nascido
P	Pericardite
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Pe	Peritonite
Ph	Peri-hepatite
RNA	Rede Neural Artificial
RNAs	Redes Neurais Artificiais
rpm	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SIF	Sistema de Inspeção Federal
STEC/EHEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
SCI	Síndrome da Cabeça Inchada
SIM	<i>Sulphide Indol Motility</i>
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogênica
Teste ²	Teste estatístico qui-quadrado
TM	Tempo de Morte
U	Unidade
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônias por gramas
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	<i>Escherichia coli</i>	19
2.2	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Aviária (APEC)	20
2.3	Fatores associados à virulência	22
2.4	Significância econômica	26
2.5	Significância em Saúde Pública	27
2.6	Redes Neurais Artificiais	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Local de estudo	33
3.2	Amostras bacterianas e Índice de Patogenicidade (<i>in vivo</i>)	33
3.3	Reativação das amostras, teste de motilidade e extração de DNA	34
3.4	Pesquisa de genes associados à virulência	35
	3.4.1 <i>Primers</i>	35
	3.4.2 Protocolos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	35
3.5	Análise estatística	36
3.6	Construção das Redes Neurais Artificiais	36
4	RESULTADOS	38
4.1	Análise descritiva	38
	4.1.1 Motilidade	38
	4.1.2 Ensaios de PCR	39
	4.1.3 Distribuição dos genes associados à virulência	40
	4.1.4 Índice de Patogenicidade (<i>in vivo</i>)	42
4.2	Significância estatística entre os genes associados à virulência	42
4.3	Redes Neurais Artificiais	44
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	50
7	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICE A - Função, genes alvos e características	61
	APÊNDICE B - Sequência de cada primer e fonte bibliográfica dos genes pesquisados	62

**APÊNDICE C - Relação dos protocolos e o número de pares de bases (pb)
de cada gene 64**

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento e vem conquistando os mais exigentes mercados. O País se tornou o terceiro produtor mundial e líder em exportação. Atualmente, a carne nacional chega a 142 países, com uma taxa de crescimento nas exportações prevista em 5,62% ao ano (BRASIL, [2012]). A produção da carne de frango em 2011 chegou a 13,058 milhões de toneladas, em um crescimento de 6,8% em relação a 2010. Com esse desempenho o Brasil se aproxima da China, hoje o segundo maior produtor mundial, cuja a produção de 2011 teria somado 13,2 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos, com 16,757 milhões de toneladas. Do volume total de frangos produzidos pelo país, 69,8% foram destinados ao consumo interno e 30,2% para exportações. Com isto, o consumo per capita de carne de frango atingiu 47,4 quilos por pessoa, um novo recorde para o setor (UBABEF [2012]).

Fatores como qualidade, sanidade e preço contribuíram para aperfeiçoar a produtividade. O Brasil buscou modernização e empregou instrumentos como manejo adequado do aviário, sanidade, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada (BRASIL [2012]). Contudo, com o desenvolvimento industrial, os alimentos passaram a serem produzidos em massa. Para isso, tendo-se como exemplo a avicultura, procurou-se, mais e mais, melhorar a capacidade de produção e, ao mesmo tempo que a avicultura expandiu-se no mundo inteiro, aumentou-se exponencialmente a quantidade de animais, concentrando-se muito mais aves por metro quadrado. Esta situação, tão importante para viabilizar a avicultura industrial, favorece a instalação, multiplicação e disseminação de agentes patogênicos. Patologias como salmonelose, colibacilose e micoplasmose, que são endêmicas em certas granjas, levam a produção mais baixa, à qualidade inferior do produto, ou até mesmo a mortalidade (BERCHIERI, 2009).

Há um consenso geral que a colibacilose é a doença bacteriana infecciosa mais comum de frangos de corte, a qual se refere a infecções localizadas ou sistêmicas, causadas total ou parcialmente pela *Escherichia coli*. Infecções por *E. coli* em suas várias formas são responsáveis por significantes perdas econômicas e frequentemente a colibacilose está entre as doenças mais relatadas em sanidade avícola ou condenações no processamento (BARNES *et al.*, 2008). Isso, pode ser exemplificado por Santana *et al.* (2008) em um matadouro-frigorífico no estado de Goiás, em que 51,20% das

carcaças condenadas por doenças no processamento tinham lesões consistentes com colibacilose (celulite aviária) e por Ferreira *et al.* (2012), onde esta mesma lesão também encontra-se entre as três principais causas de condenações de carcaças de frangos em matadouros-frigoríficos no sul do Brasil. Pesquisadores tem demonstrado que infecções causadas por *E. coli* em frangos de corte e perus contribuem para uma menor produção, falta de uniformidade e menor ganho de peso, ocasionando um aumento da contaminação fecal, erros de processamento e aumento na população de bactérias patogênicas no produto final (RUSSEL *et al.*, 2003; MARRETT *et al.*, 2000).

A *E. coli*, além de estar relacionada com celulite aviária e aerossaculite, interage com o hospedeiro e o ambiente, podendo assim, causar colisepticemia ou outras lesões como peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, pericardite, coligranuloma, doença respiratória crônica complicada (DRCC), onfalite, salpingite, síndrome da cabeça inchada (SCI), panoftalmia, osteomielite, ooforite e sinovite (FERREIRA; KNÖBL, 2009). A mortalidade acumulada é normalmente entre 5 a 10% durante um surto isolado (VANDEKERCHOVE *et al.*, 2004; BARNES *et al.*, 2008), mas a proporção de frangos que sofrem a doença pode chegar a 50% (ASK, 2006). As perdas chegam a milhões de dólares por ano devido a mortalidade, perda na produção e condenação de carcaças (BARNES *et al.*, 2008).

Atualmente as pesquisas com *E. coli* estão voltadas para identificação de fatores de virulência associados a patogênese bacteriana, incluindo adesinas, toxinas, fatores de aquisição de ferro, lipopolissacarídeos, cápsulas de polissacarídeo e invasinas, e vários pesquisadores tem associado a transferência dos mesmos para outros patótipos de *E. coli* que causam infecções em seres humanos, como as *E. coli* uropatogênicas (UPEC) e *E. coli* associada a meningite do recém nascido (NMEC) (EWERS *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2012; SPURBECK *et al.*, 2012). Entretanto, essas pesquisas acabam tornando-se imprecisas quando apenas indicam a presença ou ausência desses fatores de virulência, ou quando ocorre agrupamento dos fatores mais frequentes, não diferenciando cepas patogênicas de apatogênicas, que por consequência continua sendo um problema no diagnóstico e nas tomadas de decisões pelos veterinários de campo. Muito provavelmente isso ainda acontece devido à complexidade das interações que existem entre os fatores de virulência das *E. coli* e ao fato dos procedimentos convencionais para a determinação da patogenicidade das *E. coli*, nos quais se inoculam animais, serem demorados, caros e eticamente questionados pela comunidade internacional (SALLE *et al.*, 2011).

Seguindo a linha de pesquisa do programa de isolamento e identificação de amostras de *E. coli* de origem aviária e utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais) do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Rocha (2006) desenvolveu três redes neurais artificiais para classificação da patogenicidade de 293 cepas de *E. coli*. Os resultados obtidos nesta pesquisa chegaram às classificações corretas de 54,27%, 80,55% e 83,96%, para as redes um, dois e três, respectivamente. A primeira rede desenvolvida por Rocha (2006) classificou a patogenicidade de amostras de *E. coli* em 11 categorias (0 à 10), já as redes dois e três sofreram modificações nos seus dados, com o agrupamento das amostras conforme seus índices de patogenicidade: a rede dois recebeu informações de três categorias (apatogenicas-patogenicidade baixa / patogenicidade intermediária / patogenicidade alta) e a rede três de duas categorias (apatogenicas-patogenicidade baixa / patogenicidade alta).

Em consequência do sucesso dessa ferramenta no primeiro momento, mas ao mesmo tempo com a diminuição das categorias realizada por Rocha (2006), vimos a necessidade de melhorá-la, sem fazer agrupamentos, buscando assim, construir modelos mais ajustados para uma classificação precisa (0 à 10) da patogenicidade das *E. coli*. Com isso, o objetivo deste trabalho foi construir uma rede neural artificial capaz de prever a patogenicidade de amostras de *E. coli* de origem aviária de zero a dez, com a máxima precisão possível e, assim, disponibilizar aos médicos veterinários uma ferramenta que possa fornecer laudos mais precisos, incluindo além do nome do bactéria e antibiograma, o grau da patogenicidade da mesma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* é composto de várias espécies, mas somente a *E. coli* é um importante patógeno dos animais (HIRSH; ZEE, 2003). A *E. coli* é uma espécie da família *Enterobacteriaceae* extremamente heterogênea e complexa (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008), foi descrita pela primeira vez, em 1885, por Theodor von Escherich. É um bastonete curto, com coloração Gram negativa, não esporulado, cujo tamanho varia de 1,1 a 1,5 µm por 2-6 µm, é um anaeróbio facultativo, a maioria das amostras é móvel, devido à existência de flagelos peritríqueos e crescem em temperaturas que podem variar de 18°C a 44°C, sendo ideal a temperatura de 37°C (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

A *E. coli* cresce bem nos meios de cultivos comuns. Formam colônias de tamanho médio (diâmetro de 2 a 3 mm) lisas, brilhantes em ágar sangue a 37°C em 24 horas e alguns sorotipos são hemolíticos, formando halo de beta hemólise. No meio de cultivo MacConkey formam colônias de cor rosa avermelhada, enquanto no meio eosina-azul de metileno as colônias são verde metálicas (OLIVEIRA, 2000). A produção de ácido e gás ocorre após a fermentação da glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramanose, sorbitol e arabinose. A fermentação do adonitol, sacarose, salicina, rafinose, ornitina, dulcitol e arginina é variável. A maioria das amostras possui capacidade de fermentar a lactose, embora algumas amostras apresentem uma fermentação tardia (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

A diversidade patogênica de *E. coli* é enorme, a espécie compreende várias categorias de amostras que causam infecção intestinal por diferentes mecanismos e várias outras especificamente associadas com infecções urinárias, meningites e infecções extra-intestinais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Atualmente, seis distintas categorias patogênicas (patotipos) de amostras de *E. coli* patogênica intestinal são conhecidas: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), EAEC (*E. coli* enteroagregativa), STEC/EHEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga), DAEC (*E. coli* difusamente aderente) (RUSSO; JOHNSON, 2000; KAPER, *et al.*, 2004). Além destas, Russo e Johnson (2000) propuseram a denominação ExPEC (*E. coli* patogênica extra-intestinal) para englobar todas as *E. coli* que são isoladas de infecções extraintestinais, entre estas, encontram-se

as UPEC (*E. coli* uropatogênica), NMEC (*E. coli* associada à meningite neonatal) e APEC (*Escherichia coli* patogênica aviária).

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 fímbrias (P), os quais são usados para sorotipagem de *E. coli*. Os antígenos somáticos são de natureza lipopolissacarídica localizando-se na superfície da parede celular. Os antígenos flagelares são de natureza proteica e os antígenos capsulares são compostos de polissacarídeos. Antígenos proteináceos fimbriais agem como adesinas, facilitando a aderência nas superfícies das mucosas (QUINN *et al.*, 2005). Os sorotipos de *E. coli* são classificados conforme o esquema de Kauffmann White e existem aproximadamente 180 antígenos O, 60 antígenos H e 80 antígenos K, mas na maioria dos esquemas de tipificação sorológica somente o antígeno O e o H são determinados, como por exemplo a *E. coli* O157:H7, um importante patógeno de doenças gastrointestinais em humanos. O “antígeno O” determina o sorogrupo enquanto o “antígeno H” determina o sorotipo (BARNES *et al.*, 2008).

Além da caracterização fenotípica e sorotípica, os isolados de *E. coli* podem ser caracterizados pela resistência antimicrobiana, toxigenicidade, presença de adesinas ou outros fatores de virulência, fixação em células, hemaglutinação e perfil plasmidial (BARNES *et al.*, 2008). Os fatores de virulência de linhagens patogênicas de *E. coli* incluem cápsula, endotoxina, estruturas responsáveis por colonização como adesinas, invasinas, sistema de aquisição de ferro, resistência sérica, enterotoxinas e outras substâncias secretadas (QUINN *et al.*, 2005).

2.2 *Escherichia coli* Patogênica Aviária (APEC)

As APEC são a causa de doenças extraintestinais em aves e são habitantes normais da flora gastrointestinal e do ambiente de produção, sendo possível encontrar nos aviários 10^6 UFC/g de fezes, tornando praticamente impossível a eliminação deste agente no ambiente (GROSS, 1994). Acredita-se que apenas cepas específicas de *E. coli* são dotadas de fatores de virulência, permitindo-lhes causar doença (DELICATO *et al.*, 2003), a qual manifesta-se de forma localizada ou infecções sistêmicas, assim denominada colibacilose aviária (FERREIRA; KNÖBL, 2009). A *E. coli* é responsável por vários processos patológicos nas aves, atuando como agente primário ou secundário na aerossaculite, colisepticemia, pericardite, peri-hepatite, peritonite, salpingite,

onfalite, sinovite, coligranuloma, síndrome da cabeça inchada, celulite, entre outros (ANDREATTI FILHO, 2007).

A *E. coli* acomete aves em todas as idades, porém a susceptibilidade das aves e a severidade da enfermidade são maiores em aves mais jovens. A contaminação fecal da casca do ovo fértil é uma das principais vias de transmissão de *E. coli* patogênica para os pintinhos, devido à penetração da bactéria na superfície do ovo para o seu interior (GUASTALLI; SOARES, 2011), causando onfalite e morte do embrião (FERREIRA; KNÖBL, 2009).

O trato respiratório superior das aves adultas é a principal porta de entrada na infecção por *E. coli*, ocorrendo a colonização e multiplicação do agente na traqueia, com posterior disseminação para os sacos aéreos e tecidos adjacentes (BARNES *et al.*, 2008). A *E. coli* é considerada um dos principais agentes bacterianos da aerossaculite e de quadros septicêmicos nas aves (MINHARRO *et al.*, 2001). A evolução da doença é rápida e frequentemente resulta em septicemia, também denominada coliseptemia, causando alta mortalidade (BARNES *et al.*, 2008). Os sacos aéreos tornam-se espessados com presença de exsudato caseoso (DE ROSA *et al.*, 1992).

A celulite aviária também é uma das manifestações importante que acometem frangos de corte, pois resulta em um grande número de condenações em matadouros-frigoríficos em decorrência do aspecto da carcaça (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009). Essa manifestação frequentemente vem acompanhada com uma ruptura da integridade da pele como uma lesão traumática ou outra abrasão cutânea, possibilitando uma variedade de bactérias de entrar na lesão e colonizar o tecido subcutâneo, sendo a *E. coli* isolada na maioria dos casos (NORTON, 1997). No matadouro-frigorífico as lesões de celulite são descritas por possuírem uma área de 1 x 2 cm² a 4 a 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 *et al.* 1997).

Amostras de *E. coli* que causam colibacilose aviária claramente pertencem a classe de *E. coli* patogênicas que invadem a corrente sanguínea a partir da superfície epitelial ou superfície das mucosas (GROSS, 1994). Acredita-se que a colibacilose aviária é uma doença secundária e que APEC, são oportunistas. Entretanto, crescentes evidências tem mostrado que existem clones de APEC que são bem adaptados como patógenos, sugerindo que infecções por APEC podem nem sempre ser oportunistas ou secundárias a alguma condição predisponente. Certamente, APEC, como outras *E. coli* patogênicas, tem adquirido genes por transferência horizontal que codificam fatores de

virulência, os quais podem estar agrupados no cromossomo ou em plasmídios localizados em ilhas de patogenicidade (BARNES *et al.*, 2008).

Considerando que os patotipos intestinais de *E. coli* já são bem definidos, nenhum gene ou grupo de genes define o patotipo APEC (EWERS *et al.*, 2007; RODRIGUES-SIEK *et al.*, 2005). No entanto, sabe-se que os genes de virulência mais frequentemente associados à patogenicidade APEC incluem as adesinas, resistência sérica, sistema de aquisição de ferro, colicina V, hemolisina (JOHNSON *et al.*, 2006), a multiresistência a drogas antimicrobianas, a motilidade, a presença de grandes números de plasmídeos e a invasibilidade celular (BARNES *et al.*, 2008). A motilidade das amostras cresce em importância, pois os flagelos bacterianos permitem que as amostras de *E. coli* se disseminem para novos sítios, tanto para obter nutrientes, quanto para escapar da resposta imune do hospedeiro (LANE *et al.* 2007). A fim de definir a relação genética de isolados APEC, uma grande variedade de genes de virulência são pesquisados para ganhar uma compreensão mais profunda deste patotipo (EWERS *et al.*, 2007, BARBIERI *et al.*, 2012).

A habilidade de causar mortalidade em embriões e pintinhos diferenciam APEC de amostras comensais de *E. coli* (GIBBS *et al.*, 2004; MONTGOMERY *et al.*, 2005). Vários modelos são utilizados *in vivo*, como a inoculação em pintinhos de um dia de idade, em que os modelos se diferenciam pelo número de animais inoculados, dias de observações, via de inoculação e forma de classificação, mas a maioria dos testes apenas acompanha a mortalidade dos animais, não diferenciando amostras de *E. coli* letais para todos os animais no primeiro dia, daquelas que são menos letais, com a mortalidade de todos os animais em cinco, sete ou dez dias de observações (ANTÃO *et al.*, 2008). Souza (2006) desenvolveu um teste de patogenicidade capaz de diferenciar essas amostras, utilizando dez pintinhos de um dia de idade, com inoculação subcutânea de 10^8 UFC/mL de *E. coli*, observando esses animais por sete dias, analisando lesões e o tempo de mortalidade dos animais, podendo, assim, chegar a um escore de zero a dez para cada amostra inoculada.

2.3 Fatores associados à virulência

Linhagens patogênicas de *E. coli* possuem fatores de virulência que permitem a colonização das superfícies das mucosas e a subsequente produção da doença (QUINN *et al.*, 2005). A aderência das APEC na superfície epitelial, mediada pelas adesinas, é

um importante evento inicial na sua interação com o hospedeiro, levando a colonização e infecção (DOZOIS *et al.*, 1992), estas estão localizadas ao longo ou na ponta das fímbrias (SMYTH *et al.*, 1994). Muitas bactérias apresentam apêndices de vários tamanhos e vários aspectos em sua superfície chamados de pili e fimbria. O termo pili, entretanto, deve ser reservado para apêndices envolvidos na conjugação bacteriana, que é a transferência de material genético, e o termo fimbria deve ser reservado para estruturas responsáveis pela adesão da bactéria em várias superfícies, incluindo superfícies celulares. Em média, de uma à dez pili conjugadas e mais de 400 fímbrias podem estar presentes na superfície de uma célula bacteriana (ANTÃO *et al.*, 2009).

Entre as diversas fímbrias encontradas em *E. coli* a fimbria F1 é principalmente expressada na traqueia, sacos aéreos e pulmões, e não em outros órgãos ou no sangue de galinhas infectadas experimentalmente, o que sugere que a mucosa da traqueia de frangos possui receptores para fimbria F1 (POURBAKSHSH *et al.*, 1997). O “operon” *fim* é o responsável por codificar a fimbria F1 (HULL *et al.*, 1981), o qual compõem um conjunto de pelo menos oito genes, entre eles *fimA*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE*, *fimF*, *fimG* e *fimH* (MOL & OUDEGA, 1996). A fimbria P parece não ser importante para colonização inicial da bactéria no trato respiratório superior, mas desempenha um importante papel nos estágios posteriores da infecção (POURBAKSHSH *et al.*, 1997). A fimbria P é codificada por um conjunto de 11 genes cromossômicos denominado “operon” *pap*, os quais são definidos como: *papA*, *papB*, *papC*, *papD*, *papE*, *papF*, *papG*, *papH*, *papI*, *papJ*, *papK* (LATHAM & STAMM, 1984). A fimbria curli, codificada pelo gene *crl* (gene fimbria Curli) é uma adesina formada por uma estrutura enrolada encontrada na superfície externa das cepas de *E. coli* (ANTÃO *et al.*, 2009) e esta presente na maioria dos isolados de aves (LECLERC *et al.*, 2003).

Vários outros tipos de adesinas são pesquisados em amostras APEC, como a adesina afimbrial Tsh (Hemaglutinina sensível à temperatura), importante na adesão bacteriana, que é codificada pelo gene *tsh* e está relacionada à atividade de hemaglutinação de eritrócitos de galinhas (PROVENCE & CURTISS, 1994); a fimbria S, que é codificada pelo gene cromossômico *sfa/focCD* (ácido siálico específicos e fímbrias F1CD), o qual esta associado à meningite do recém-nascido (NMEC) (ANTÃO *et al.*, 2009); a adesina codificada pelo gene *afa*, a qual está associada às *E. coli* enteropatogênicas e uropatogênicas humanas (ANTÃO *et al.*, 2009); a adesina codificada pelo gene *iha* (gene homólogo-ferro-regulado), que confere à bactéria a habilidade de aderir-se ao uroepitélio (JOHNSON & RUSSO, 2005); a adesina

codificada pelo gene *felA*, que está associada a quadros de colissepticemia (DEREE *et al.*, 1985); e a fímbria *mat*, codificada pelo gene *mat* (fímbrias associadas a meningite e regulação da temperatura) (POUTTU *et al.*, 2001).

Muitos patógenos desenvolveram estratégias para anexar, invadir e atravessar o epitélio. Entre essas estratégias, algumas bactérias patogênicas rompem a barreira do epitélio por ser citotóxicas às células epiteliais (KEHL-FIE & GEME, 2007) ou pela ativação de seu programa de apoptose (KIM *et al.*, 1998), enquanto outras atravessam o epitélio invadindo células epiteliais ou através do cruzamento entre elas (KIM, 2008). Entre os genes de virulência associados à invasão em cepas APEC encontram-se o homólogo de proteína Tia (invasão de locus toxigênicos em ETEC), a ilha de patogenicidade *gimB* (ilha genética associada com a meningite neonatal) e o gene *ibeA* (proteína de invasão do endotélio cerebral de *E. coli*) (EWERS *et al.*, 2007). O gene *ibeA* contribui para invasão das células endoteliais microvascular cerebral (BMEC) causando meningite neonatal, o qual também é encontrado em amostras APEC. As habilidades da amostra APEC/BEM-2908 invadir BMEC humanas e também causar colibacilose aviária são significativamente reduzidas quando *ibeA* é inativado (BARNES *et al.*, 2008).

Um fator de virulência comum em microrganismos que causam infecções sistêmicas em humanos e animais é a capacidade de se multiplicar em meios com restrição do íon ferro (SUSSMAN, 1997). Compostos de ferro são conhecidos por melhorar o crescimento de bactérias, incluindo *E. coli*. Esses nutrientes podem ser obtidos do ambiente aonde o ferro está geralmente presente na forma insolúvel ou ligado a um ligante orgânico (MONTGOMERIE *et al.*, 1984). *E. coli* podem efetuar o transporte deste mineral por meio dos sistemas ferricromo, enterobactina, citrato e aerobactina (WOODROW *et al.*, 1978). O sistema aerobactina é a forma de captação e transporte de ferro mais utilizada pela bactéria (MONTGOMERIE *et al.*, 1984).

A aerobactina é codificada pelo operon composto pelos genes *iucABC* e *iut*, que podem estar em plasmídeos ou no cromossomo (VIDOTTO *et al.*, 1990). O sistema transportador de ferro é codificado pelo gene *sitABCD* (gene do sistema de transporte de ferro da *Salmonella*), que pode ser encontrado no cromossomo (SABRI *et al.*, 2006). Existem outros genes que também tem a função de aquisição de ferro, entre eles podemos encontrar: *fyuA* (aerobactina-férrica captação de *Yersinia*) e *irp2* (proteína ferro repressor) (SCHUBERT *et al.*, 2002), *chuA* (gene da proteína Heme – transporte – de EHEC) (LI, *et al.*, 2005), e *ireA* (elemento ferro-responsivo) (RUSSO *et al.*, 2001).

A resistência sérica também parece ser um 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). Por exemplo, a resistência sérica tem sido frequentemente associada com isolados de septicemia de perus e galinhas (DOZOIS *et al.*, 1992). 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). O gene que codifica a proteína Iss (aumento da sobrevivência sérica), o gene cromossômico *ompA* (proteína da membrana externa) que codifica uma proteína da membrana externa (NOLAN *et al.*, 2003), a proteína TraT codificada pelo gene *traT* (proteína de transferência) (SUKUPOLVI *et al.*, 1990), a cápsula do tipo K1, codificada pelo gene *neuC* (polissacarídeo capsular K1) (BRÉE *et al.*, 1989), são alguns genes envolvidos na resistência sérica da APEC.

As bactérias patogênicas produzem muitas substâncias que são diretamente ou indiretamente tóxicas para as células do hospedeiro. Algumas proteínas microbianas secretadas, geralmente enzimas, são chamadas de exotoxinas, pois podem em baixas concentrações matar a célula (FINLAY & FALKOW, 1997). Algumas linhagens de *E. coli* são capazes de produzir toxinas, como as enterotoxinas termolábeis e termoestáveis (SMITH & GYLES, 1970) e as verotoxinas, conhecidas também como “*shiga-like toxins*” (PARREIRA & YANO, 1998).

Várias toxinas produzidas pelas *E. coli* já foram descritas, entre elas podemos citar: a toxina de vacuolização codificada pelo gene *vat* (toxina autotransportadora) que induz a formação de vacúolos intracelulares, resultando em efeitos citotóxicos (PARREIRA & GYLES, 2003), a hemolisina A ou α -hemolisina que é codificada pelo gene *hlyA* (hemolisina A), as quais são proteínas que são secretadas extracelularmente por algumas cepas de *E. coli* e possuem uma ação citotóxica para uma variedade de tipos de células (FINLAY & FALKOW, 1997), uma toxina chamada de EAST1 (citotoxina termoestável associada a *E. coli* enteroagregativa) que é codificada pelo gene *astA*, o qual foi primeiramente observado em cepas de *E. coli* enteroagregativa (MÉNARD *et al.*, 2002), uma toxina codificada pelo gene *cnf 1/2* (fator necrosante citotóxico) (DE RYCKE *et al.*, 1999), e a proteína Sat que é codificada pelo gene *sat* (toxina autotransportadora secretada) (GUYER *et al.*, 2000).

2.4 Significância econômica

A colibacilose em todas as suas formas é uma das mais significantes doenças infecciosas na produção de aves, resultando em grandes perdas anuais para a indústria avícola devido a mortalidade, perdas na produção, condenações de carcaças (RODRIGUES-SIEK *et al.*, 2005), custos com medicação e a intensificação de outras doenças respiratórias provocadas por micoplasmas, vírus ou outras bactérias (ANDREATTI FILHO, 2007). Quando a *E. coli* atinge pintinhos na fase embrionária ocorre um aumento da mortalidade no incubatório e os pintinhos que sobrevivem ao nascimento e à disseminação da bactéria nos primeiros de vida, podem apresentar casos de infecções graves, comprometendo o seu desenvolvimento, tornando-os portadores e susceptíveis a várias enfermidades. As perdas econômicas são elevadas, podendo estender-se por toda vida da ave (GUASTALLI; SOARES, 2011).

A aerossaculite é uma das principais lesões responsável por condenação total e parcial durante o abate, encontrada na linha de inspeção *post-mortem* (BRANCO, 2004). A perda de peso pelas aves, causada pela aerossaculite, pode ocasionar uma série de falhas tecnológicas durante o abate, como cortes no trato digestivo, pois os equipamentos na linha de abate não se ajustam ao tamanho menor das carcaças. Este erro tecnológico leva a um aumento no percentual de contaminação fecal das carcaças e, portanto, há um maior risco de contaminação das mesmas por bactérias patogênicas que causam infecções intestinais em humanos, como *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e a própria *E. coli* (RUSSEL, 2003).

A celulite aviária resulta em um grande número de condenações nos abatedouros, devido ao aspecto repugnante da carcaça (FERREIRA; KNÖBL, 2009). Em um estudo realizado em dois abatedouros-frigoríficos (A e B), localizados na região sudeste do estado de Goiás, Brasil, revelou que a celulite aviária é uma das principais causas de condenações de carcaças, entretanto, os valores observados, para cada um dos frigoríficos foram diferente. O “frigorífico A” verificou que a celulite foi a maior causa de condenação, com 51,20% do total de condenações, seguido por 33,61% de contaminação na evisceração e 5,67% de contusão/fratura e hematomas. Em “B”, a maior causa foi 28,90% para contusões/fraturas e hematomas, seguido de 25,27% para celulite e 22,50% para contaminação (SANTANA *et al.*, 2008). Em outra análise de dados, realizado entre janeiro de 2009 a junho de 2011, Ferreira *et al.* (2012) relataram que a celulite aviária está entre as três principais causas de condenações de carcaças de

frangos de corte em abatedouros-frigoríficos sob Sistema de Inspeção Federal (SIF) no sul do Brasil, corroborando com o autor anterior.

Quando a *E. coli* atinge poedeiras e matrizes pode ocorrer o comprometimento do trato reprodutivo das aves, causando salpingite, onde os animais afetados geralmente veem à óbito em aproximadamente seis meses e as sobreviventes raramente voltam a produção normal de ovos (FERREIRA; KNÖBL, 2009). A colibacilose aviária esta presente em toda a cadeia avícola mundial, no entanto, apesar da sua importância reconhecida, não há estudos para definir com precisão o significado econômico desta enfermidade (BARNES *et al.*, 2008).

2.5 Significância em Saúde Pública

O conhecimento sobre as características de virulência de patótipos de *E. coli*, que causam frequentes infecções nos homens e animais, tem aumentado consideravelmente ao longo dos anos. Ewers *et al.* (2007) após pesquisas com cepas APEC, UPEC e NMEC suportaram quatro hipóteses: que as aves podem ser veículos ou reservatórios para amostras ExPEC humanas, que amostras APEC servem como um reservatório de genes associados a virulência para UPEC e NMEC, que algumas amostras ExPEC, embora de diferentes patótipos, podem compartilhar ancestrais comuns e que subgrupos APEC tem de ser considerados agentes com potencial zoonótico.

Bauchart *et al.* (2010) compararam os transcriptomas de uma ExPEC humana e um isolado APEC O18:K1 em resposta a temperatura corporal humana (37°C) e aviária (41-42°C) para identificar genes que são especialmente transcritos nessas condições. Em resumo, a ExPEC humana e a amostra APEC exibem conjuntos de genes de virulência congruentes e a comparação do transcriptoma humano, bem como o isolado aviário, identificou concordantes padrões em resposta a temperatura corporal humana e aviária e apoia um comportamento semelhante destas amostras após a mudança de temperatura, excluindo a hipótese que a temperatura corporal dirige hospedeiro espécie específica para amostras APEC.

Olsen *et al.* (2012) compararam genotipicamente vários plasmídeos APEC e um alto grau de similaridade foi observado entre genes de virulência de *E. coli* de origem aviária comparados com outras ExPEC, incluindo amostras NMEC e UPEC. Os resultados desses autores também suportam a ideia de que APEC e certas ExPEC

humanas podem ser zoonóticas e que APEC pode ser considerada um reservatório para genes associados a virulência de ExPEC humanas ou compreendem ter um elevado potencial patogênico para o ser humano.

Além disso, diferentes patógenos têm sido associados às doenças de transmissão alimentar, tais como *E. coli* enterohemorrágica sorotipo O157:H7, *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *Yersinia enterocolítica* e *Shiguella spp* (RIBEIRO *et al*, 1999). A *E. coli* O157:H7 causa nos seres humanos colite hemorrágica e síndrome urêmica (SHU), enfermidade de grande gravidade que leva a falência renal e morte (NATARO; KAPER, 1998). Doyle e Schoeni (1987) isolaram *E. coli* O157:H7 em 3,7% de retalhos de carne bovina, 1,5% de suínos e 1,5% de frangos.

2.6 Redes Neurais Artificiais

Segundo Fernandes (2008) é possível se chegar a várias definições do que seja uma Rede Neural Artificial (RNA), contudo, as três “palavras-chave”: neurônio, arquitetura e aprendizagem, requerem um entendimento, a priori, em qualquer definição de RNA. O neurônio é a unidade computacional básica da rede em questão; a arquitetura é a estrutura topológica de como os neurônios são conectados; e a aprendizagem é um processo que adapta a rede de modo a computar uma função desejada ou realizar uma tarefa.

A rede neural artificial é uma técnica de Inteligência Artificial (IA) que tenta simular em máquinas (computadores) o funcionamento do cérebro humano, buscando implementar modelos matemáticos que se assemelhem às estruturas neurais biológicas (FERNEDA, 2006).

Segundo Braga *et al.* (2000), as Redes Neurais Artificiais (RNAs) podem ser definidas como:

Sistemas paralelos distribuídos, compostos por unidades de processamento simples (nodos) que calculam determinadas funções matemáticas (normalmente não-lineares). Tais unidades são dispostas em uma ou mais camadas e interligadas por um grande número de conexões, geralmente unidirecionais. Na maioria dos modelos estas conexões estão associadas a pesos, os quais armazenam o conhecimento representado no modelo e servem para ponderar a entrada recebida por cada neurônio da rede. O funcionamento destas redes é inspirado em uma estrutura física concebida pela natureza: o cérebro humano.

Os principais componentes dos neurônios biológicos são: os dendritos, que têm por função receber os estímulos transmitidos pelos outros neurônios; o corpo do neurônio, também chamado de soma, que é responsável por coletar e combinar informações vindas de outros neurônios; e o axônio, que é constituído de uma fibra tubular que pode alcançar até alguns metros e é responsável por transmitir os estímulos para outras células (LUDWIG JR.; MONTGOMERY, 2007). Uma rede neural artificial é composta por várias unidades de processamento, cujo funcionamento é bastante simples. Essas unidades, geralmente são conectadas por canais de comunicação que estão associados a determinado peso. As unidades fazem operações apenas sobre seus dados locais, que são as entradas recebidas pelas suas conexões (FERNANDES, 2008).

O neurônio matemático, similarmente ao natural, recebe um ou mais sinais de entrada e devolve um único sinal de saída, que pode ser distribuído como sinal de saída da rede, ou como sinal de entrada para um ou vários outros neurônios da camada posterior. Os sinais de entrada chegam simultaneamente aos neurônios, por isso as redes são classificadas como instrumentos de processamento paralelo. Os dendritos e axônios são representados matematicamente apenas pelas sinapses e a intensidade da ligação é representada por uma grandeza denominada peso sináptico, simbolizado pela letra w . Quando as entradas, x , são apresentadas ao neurônio, são multiplicadas pelos pesos sinápticos correspondentes, gerando as entradas ponderadas. O neurônio, então, totaliza todos os produtos e o resultado deste somatório é denominado pela letra v (LUDWIG JR.; MONTGOMERY, 2007). O esquema de um neurônio matemático é representado na Figura 1.

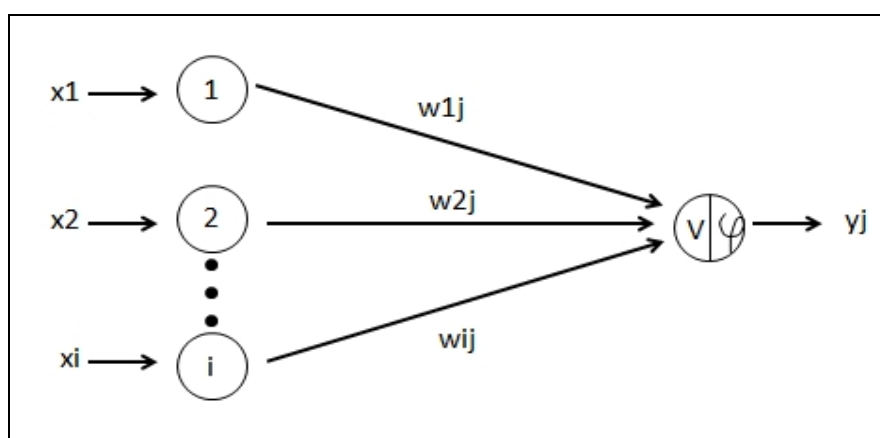


Figura 1: Esquema de um neurônio matemático. Legenda: (x) Entradas apresentadas; (w) Peso sináptico; (v) Resultado do somatório; (y) Variável de saída. Fonte: LUDWIG JR.; MONTGOMERY, 2007.

Um sistema de IA deve ser capaz de fazer três coisas: armazenar conhecimento, aplicar o conhecimento armazenado para resolver problemas e adquirir novo conhecimento através da experiência. Um sistema de IA tem três componentes fundamentais: representação, raciocínio e aprendizagem (HAYKIN, 1999). As RNAs calculam determinadas funções matemáticas normalmente não-lineares. As unidades das RNAs são dispostas em uma ou mais camadas e interligadas por um grande número de conexões, geralmente unidirecionais. Na maioria dos modelos essas conexões estão associadas a pesos, os quais armazenam o conhecimento representado no modelo e servem para ponderar a entrada recebida por cada neurônio da rede (BRAGA *et al.*, 2000).

As RNAs são aptas a resolver problemas de cunho geral, tais com aproximação, classificação, categorização, predição, entre outros, com isso, a gama de áreas onde elas podem ser aplicadas é bastante extensa (BRAGA *et al.*, 2000). Embora o nível de complexidade que se possa representar uma RNA, a mesma ainda é muito inferior ao cérebro humano, o qual lhe serviu de inspiração, mas ao mesmo tempo a sua capacidade de aprendizado fez com que se tornasse uma tecnologia promissora e uma candidata natural para realizar tarefas para as quais soluções algorítmicas não sejam eficientes ou mesmo conhecidas (BASTOS, 2007).

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 RNA vem das inúmeras interações possíveis entre as unidades de processamento da rede (KOVACS, 1996).

As RNAs exploram simultaneamente muitas hipóteses utilizando regras de aprendizagem que permitem adquirir poder de generalização suficiente para reconhecer padrões e prever cenários (HAYKIN, 1999). Os modelos de redes neurais têm potencial de aplicação na produção animal quando é necessário um banco de dados que permita a compreensão das relações entre o ambiente e a exploração agropecuária (SALLE *et al.*, 2001; RONDÓN *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2010).

As principais vantagens de utilização das redes são a tolerância a falhas, a aplicação em tempo real, a capacidade de autoadaptação 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).

O objetivo de definição da rede é resolver o problema com a menor estrutura possível, com potencial de aplicação em situação que requeiram classificação de padrões, identificação e associação de padrões, aproximação de funções e aprendizado em áreas em que é difícil criar modelos precisos da realidade e com frequentes mudanças de ambiente (HAYKIN, 1999).

Dentre as várias aplicações das RNAs, muitas se encontram aplicadas à engenharia no controle de processos e reconhecimento de padrões (LUDWIG JR.; MONTGOMERY, 2007). Além disso, outras áreas de aplicação das RNAs podem ser citadas, como: *Data Mining* (localizar dados em bancos de dados complexos e em sites da *web*); fraudes tributárias (identificar, localizar e assinalar irregularidades); serviços financeiros (identificar padrões de dados sobre o mercado de ações e auxiliar em estratégias de negociação de ações e títulos); avaliação de pedidos de financiamento (avaliar seriedade dos pedidos de financiamento); análise de novos produtos (previsão de vendas e marketing dirigido); gestão de tarifas aéreas (procura de assentos e escalas de tripulação); alocação de recursos baseada em dados históricos e experimentais (descobrir alocações que maximizem os resultados); validação de assinaturas (comparação e confirmação de assinaturas com amostras no cadastro); previsões (antecipar as exigências de comportamento); detecção de fraudes contra administradoras de cartões de créditos (análise de padrões de compra para detecção de fraude); entre outros (KARRER *et al.*, 2005).

Na área de produção animal, muitos pesquisadores já provaram a eficiência das RNAs. Park *et al.* (1998) utilizaram RNAs para análise de imagens de carcaças de frangos, gerando critérios de aceitação e rejeição, obtendo uma margem de acerto da predição, acima dos 95%, além de, fugir do erro imposto pelo cansaço do agente de inspeção após repetidas observações; Roush *et al.* (1997) utilizaram a rede neural como uma predição probabilística de ascite em frangos de corte e concluíram que as RNAs podem ser úteis na seleção de linhagens de frangos de corte que não tenham propensão a esse problema; Fernández *et al.* (2006) aplicaram as RNAs em dois trabalhos

envolvendo a predição da produção de leite de cabras e análise qualitativa dessas fazendas, e obtiveram bons resultados nas duas aplicações; Pandorfi *et al.* (2011) utilizou essa ferramenta para prever índices zootécnicos nas fases de gestação e maternidade na suinocultura e também obteve sucesso nos seus resultados.

No CDPA já foram realizados trabalhos originais na parte de produção animal utilizando redes neurais artificiais, entre eles podemos citar, o gerenciamento de: uma granja de reprodutoras pesadas (SALLE *et al.*, 2003), de frangos de corte (REALI, 2004), de um incubatório (SALLE *et al.*, 2006), de um abatedouro-frigorífico de aves e suínos (PINTO, 2006) e a união desses quatro seguimentos por Spohr (2011). Além disso, o CDPA desenvolveu RNAs para explicar alguns acontecimentos na parte de sanidade animal, Rocha (2006) utilizou as RNAs em amostras de *E. coli* isoladas de frangos de corte, Moraes (2008) estabeleceu uma nova metodologia para a avaliação da depleção linfóide folicular da bursa de Fabrícus através de análise digital de imagens e uso de RNAs e Salle (2009) utilizou as RNAs para a classificação da resistência a antimicrobianos e comportamento bioquímico de amostras de *E. coli* isoladas de frangos de corte.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

O presente estudo foi conduzido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), na Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre/RS e no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF/FEPAGRO), em Eldorado do Sul/RS.

3.2 Amostras bacterianas e Índice de Patogenicidade (*in vivo*)

Foram analisadas 489 amostras de *E. coli* isoladas e identificadas bioquimicamente de diferentes lotes de frangos de corte, destas, 280 amostras pertenciam a coleção de culturas do CDPA e 209 amostras pertenciam a coleção de culturas do Laboratório Saúde das Aves do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – IPVDF/FEPAGRO/Eldorado do Sul/RS. As amostras são isoladas de lesões de celulite (362), quadros respiratórios (54) e de cama aviária (73), as quais, em estudos anteriores foram submetidas a determinação do Índice de Patogenicidade (IP) *in vivo* (0 à 10) (SOUZA, 2006).

Souza (2006) utiliza 10 pintos de 1 (um) dia de idade para cada amostra bacteriana testada, que são inoculados via subcutânea com 0,1 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Oxoid®) contendo 10^8 UFC/mL de *E. coli* e utiliza um controle negativo de 10 pintos de 1 (um) dia, inoculados com 0,1 mL de caldo BHI estéril. Durante 7 dias após a inoculação, observa-se a taxa de letalidade e o dia de morte desses animais, que são necropsiados para verificação de lesões características a colibacilose: aerossaculite, pericardite, peri-hepatite, peritonite e celulite. Para a presença da lesão atribuí-se o valor “1” (um) e a ausência é caracterizada pelo valor “0” (zero). Nos animais mortos no primeiro dia e que não apresentam lesões compatíveis por infecção de *E. coli* tenta-se caracterizar morte por septicemia, através do isolamento bacteriano a partir do fígado. No sétimo dia, os animais remanescentes são sacrificados e submetidos aos mesmos procedimentos de necropsia.

Além dos critérios já citados, utiliza-se também o tempo de morte para determinação do IP, como segue: animais mortos nas primeiras 24 horas e com isolamento de *E. coli* positivo recebem a pontuação 1 para todos os itens observados,

totalizando 10 (índice máximo). Cada dia posterior às 24 horas da inoculação, ou seja, do segundo ao sétimo dia, há uma diminuição proporcional da pontuação, e a correção é calculada dividindo o valor 1 por 7, correspondendo a 0,14, o qual é subtraído de 1 a cada dia que o animal sobrevive. Esta constante (0,14) tem a denominação de Fator de Bonificação de Sobrevivência (FBS). As demais variáveis não sofrem qualquer alteração.

O valor obtido para o tempo de morte é multiplicado por 5 (cinco), para dar um peso cinco vezes maior a mortalidade em comparação com outras lesões estudadas. Desta forma o Índice de Patogenicidade Individual (IPI) é calculado da seguinte forma:

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

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 são divididos por 10, obedecendo a seguinte fórmula:

$$\text{IP} = \frac{(\text{IPI})}{\text{N}}$$

N = n° de pintos inoculados.

Hoje, todas as amostras fazem parte da coleção de culturas do CDPA e estão preservadas no meio de cultura BHI com glicerol em uma proporção de 4:1 a -80°C.

3.3 Reativação das amostras, teste de motilidade e extração do DNA

Uma alíquota de cada amostra foi reativada diretamente em Ágar MacConkey (Oxoid®), semeada por esgotamento e incubadas a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Uma colônia foi selecionada para realização do teste de motilidade

através do meio SIM (*Sulphide Indol Motility* - Oxoid®) (SEELEY *et al.*, 1991) e a mesma colônia selecionada para extração do DNA. A extração do DNA foi realizada através de tratamento térmico, conforme técnica descrita por Ewers *et al.* (2007). A colônia bacteriana foi solubilizada em 200 µL de água ultra pura em um microtubo de 1 mL (eppendorf®), após foi resfriada a -20°C por 10 minutos e depois concentrada por centrifugação (12.000 rpm por 2 minutos), sendo o sobrenadante desprezado e o *pellet* ressuspensionado com mais 200 µL de água ultra pura. O material foi mantido em banho-maria a 100°C por 10 minutos e o sobrenadante repassado para outro um microtubo (eppendorf®). O DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento da análise.

3.4 Pesquisa de genes associados à virulência

Foram pesquisados 38 genes de virulência, entre eles genes responsáveis pela capacidade de adesão (*afa/draB*, *crl*, *fimC*, *fimH*, *hra*, *iha*, *papC*, *papG*, *sfa/focC*, *tsh*, *mat* e *felA*), invasão (*gimB*, *ibeA*, *tia* e *cvaC*), aquisição de ferro (*chuA*, *fyuA*, *ireA*, *ironA*, *irp2*, *iucD*, *sitD chr*, *sitD ep* e *iutA*), resistência sérica (*cvi/cva*, *iss*, *neuC*, *kpsMT II*, *ompA* e *traT*), toxinas (*astA*, *cnf1/2*, *sat*, *vat* e *hlyA*), uma protease serina autotransportadora (*pic*) e uma Ilha de patogenicidade associada ao marcador CFTO 73 (*malX*). A função e a característica de cada um desses genes encontra-se no APÊNDICE A.

3.4.1 Primers

Os *primers* ou iniciadores utilizados foram sintetizados na empresa Invitrogen. A sequência e a fonte de cada *primer* encontram-se disponíveis no APÊNDICE B.

3.4.2 Protocolos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Os genes associados a virulência foram pesquisados por seis protocolos de multiplex-PCR. A presença de 33 genes foi investigada de acordo com quatro protocolos de multiplex-PCR desenvolvidos por Ewers *et al.* (2007), 3 genes através do multiplex-PCR de Rocha (2008) e os genes *fimH* e *papG* foram investigados por um multiplex-PCR desenvolvido pelo CDPA (dados não publicados). A mistura de reação deste multiplex é de 25 µL, incluindo 2,5 µL de tampão 10X, 1,25 µL de MgCl₂

2,5mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase (1,5 U), 0,5 µL de cada dNTP à 2,5 mM, 2 µL de cada um dos *primers* (20 pmol) e 5 µL de DNA bacteriano, complementado com o volume adequado de água ultra pura. A relação dos seis protocolos e o número de pares de bases (pb) de cada gene encontram-se disponíveis no APÊNDICE C.

Como controles positivos para análise dos fatores de virulência foram utilizadas as amostras IMT2470 (APEC), IMT5155 (APEC), IMT 9267 (NMEC), IMT7920 (UPEC) e TK3 (UPEC) (Ewers *et al.*, 2007) fornecidas pela Dr^a Fabiana Horn do Departamento de Biofísica-UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil e as amostras de APEC CC192 e CC158 pertencentes ao CDPA.

Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Biocycler – Peltier Thermal Cycler MJ96+/MJ96G), a eletroforese dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose à 1,5%, corado com brometo de etídio e para visualização foi utilizado o sistema de fotodocumentação através de transluminador Ultra-Violeta (UV).

Como indicador de massa molecular foi utilizado, em cada eletroforese, um marcador de 100 pb (Invitrogen®).

3.5 Análise Estatística

A análise estatística baseou-se na análise descritiva dos resultados, os quais também foram analisados através do teste χ^2 . A finalidade da utilização deste teste é baseada nas pesquisas de Ewers *et al.* (2006), Ewers *et al.* (2007) e Barbieri *et al.* (2012), os quais tentaram verificar associações entre os genes de virulência. O nível de significância adotado para o teste em questão foi de 0,05 e 0,01, os valores do χ^2 calculados foram comparados com os valores críticos da tabela referente a estas distribuições. O software utilizado foi o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS versão 18.0) para Windows.

3.6 Construção das Redes Neurais Artificiais

Antes de iniciar a construção da RNA, todos os dados das 489 amostras (pesquisa dos genes associados à virulência, motilidade e IP *in vivo*) foram transcritos para uma planilha do Microsoft Excel®, categorizando as variáveis de forma

dicotômica, ou seja, a presença do gene associado à virulência recebeu a denominação “1” (um) e a ausência “0” (zero), da mesma forma para a motilidade, terminando a caracterização de cada amostra com o IP *in vivo* (0 à 10).

Duas redes neurais artificiais foram construídas utilizando o software Neuroshell® Classifier 2.1 (Ward Systems Group, Inc., Frederick, MD, USA) em duas fases distintas: treinamento e validação. Utilizou-se todas as amostras do estudo para construção da “rede A” e 308 amostras para a construção da “rede B”. As redes apresentadas tem uma camada de entrada que inclui informações sobre a presença dos 38 genes de virulência e motilidade das amostras, com uma camada de saída formada pelo Índice de Patogenicidade (IP) *in vivo*, conforme a estrutura apresentada na Figura 2. Determinamos “camada de entrada” o conjunto de variáveis apresentadas para o cálculo do modelo e “camada de saída” a variável a ser predita.

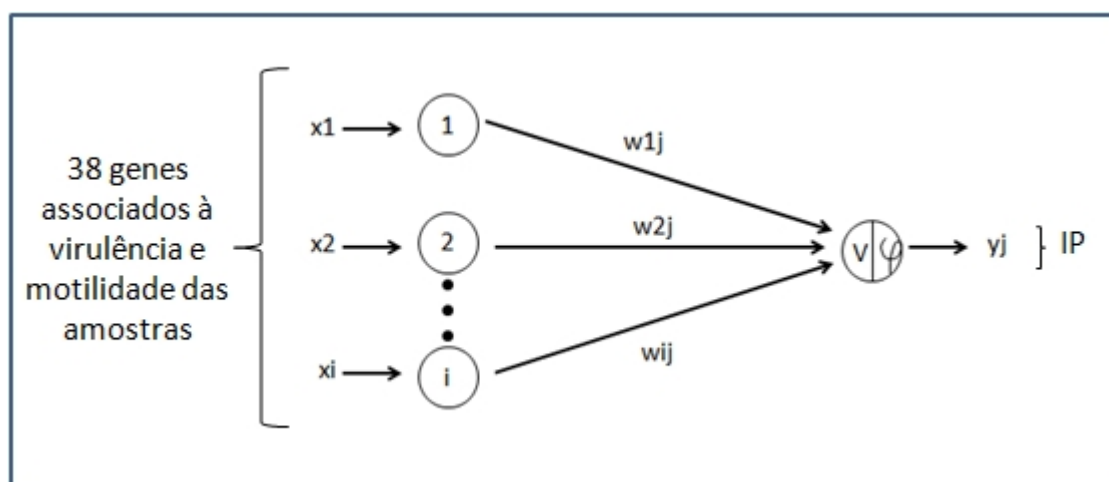


Figura 2: Estrutura das Redes Neurais Artificiais deste estudo. Legenda: Legenda: (x) Entradas apresentadas; (w) Peso sináptico; (v) Resultado do somatório; (y) Variável de saída.

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram divididos em três etapas: a primeira etapa apresenta uma análise descritiva, seguida da aplicação do teste ² e por último o resultado final das RNAs construídas.

4.1 Análise descritiva

A análise descritiva apresenta a organização e sumarização de todos os dados utilizados para a construção das RNAs.

4.1.1 Motilidade

A Figura 3 é um exemplo de como foi realizado o teste de motilidade de todas as amostras de *E. coli*: primeiro foram semeadas em Ágar MacConkey por estrias de esgotamento, após 24 horas a 37°C uma colônia isolada foi selecionada para ser inoculada no meio de cultura SIM, sendo esta mesma colônia utilizada para extração do DNA.

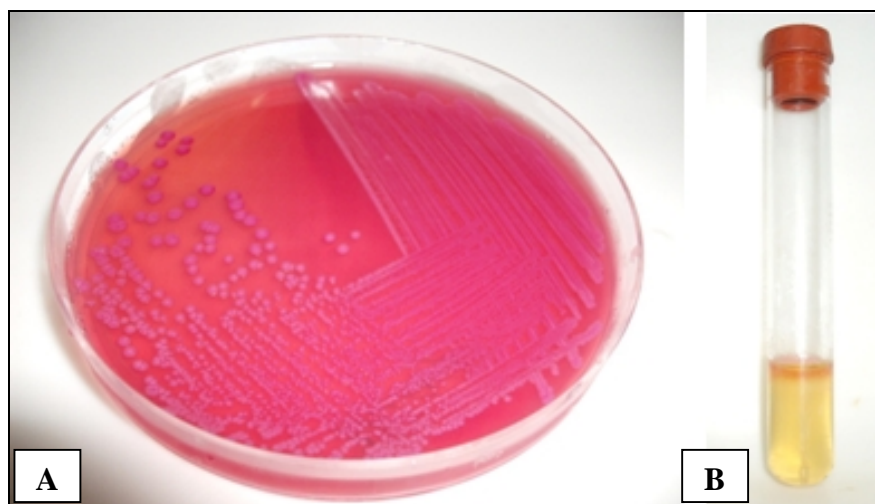


Figura 3: Colônias de *E. coli* no Ágar MacConkey (A) e teste de motilidade no meio de cultura SIM (B).

A motilidade foi considerada uma variável categórica, a qual foi classificada com 0 (zero) para ausência de motilidade e 1 (um) para amostras móveis. Uma análise traçada entre os índices de patogenicidade e a motilidade é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Número e percentual da motilidade das amostras de *E. coli* conforme seu IP (Índice de Patogenicidade *in vivo* em pintos)

IP (<i>in vivo</i>)	Motilidade		Total
	Móveis	Imóveis	
0	23 (71,87%)	9 (28,13%)	32 (100%)
1	38 (69,09%)	17 (31,91%)	55 (100%)
2	25 (64,10%)	14 (35,90%)	39 (100%)
3	24 (77,42%)	7 (22,58%)	31 (100%)
4	24 (82,75%)	5 (17,25%)	29 (100%)
5	23 (82,14%)	5 (17,86%)	28 (100%)
6	26 (70,27%)	11 (29,73%)	37 (100%)
7	45 (83,33%)	9 (16,67%)	54 (100%)
8	50 (76,92%)	15 (23,08)	65 (100%)
9	45 (66,17%)	23 (33,83%)	68 (100%)
10	38 (74,50%)	13 (25,50%)	51 (100%)
TOTAL	361 (73,82%)	128 (26,28%)	489 (100%)

4.1.2 Ensaios de PCR

O conjunto dos seis ensaios de multiplex PCR conseguiu amplificar os 38 genes associados à virulência, sendo que 33 genes foram amplificados conforme Ewers *et al.* (2007) (Figura 4), 3 genes conforme Rocha (2008) (Figura 5) e 2 genes conforme multiplex-PCR desenvolvido pelo CDPA (Figura 6).

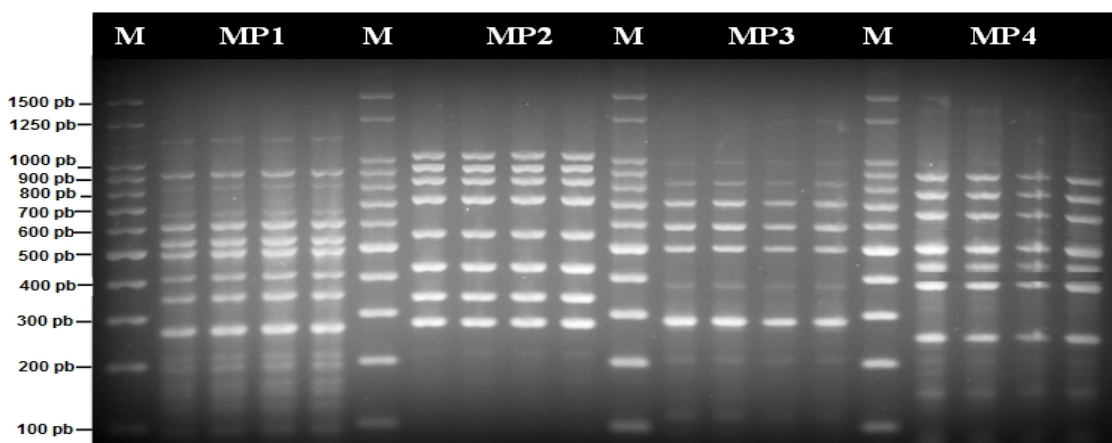


Figura 4 – Produtos de amplificação de quatro ensaios multiplex-PCR (MP1/MP2/MP3/MP4), amplificados separadamente usando conjunto de *primers*. Legenda: M: Marcador de peso molecular de 100 pb. MP 1: *pool* de DNA das amostras NMEC IMT9267 e UPEC IMT7920 (amplificações: *kpsMTII* [280 pb], *hlyA* [352 pb], *pic* [409 pb], *fimC* [477 pb], *hra* [537 pb], *iha* [609 pb], *neuC* [676 pb], *afa/draB* [810 pb], *malX* [922 pb] e *sfa/foc* [1242 pb]). MP 2: amostra APEC IMT5155 (amplificações: *chuA* [278 pb], *ibeA* [342 pb], *traT* [430 pb], *sit* chr. [554 pb], *gimB* [736 pb], *iroN* [847 pb], *ompA* [919 pb] e *sit* ep. [1052 pb]). MP 3: amostra APEC IMT2470 (amplificações: *EAST-1* [116 pb], *iss* [309 pb], *irp2* [413 pb], *papC* [501 pb], *cvi/cva* [598 pb], *iucD* [714 pb], *tsh* [824 pb] e *vat* [981 pb]). MP 4: *pool* de DNA das amostras NMEC IMT9267 e UPEC TK3 (amplificações: *crlA* [250 pb], *ireA* [384 pb], *cnf1/2* [446 pb], *tia* [512 pb], *sat* [667 pb], *fyuA* [774 pb] e *mat* [899 pb]).

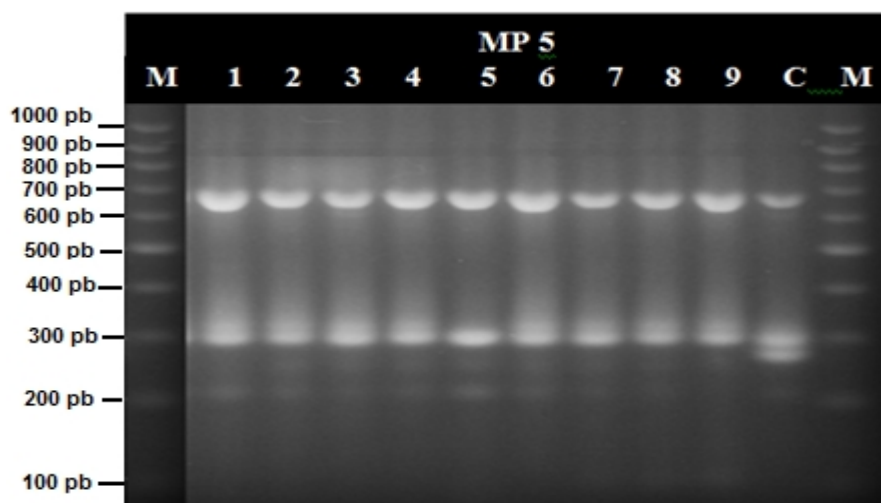


Figura 5 – Produtos de amplificação de um ensaio de multiplex-PCR (MP5), amplificados separadamente usando conjunto de *primers*. Legenda: M: Marcador de peso molecular de 100 pb. MP 5: 1 à 9 são amostras APEC isoladas de lesões de celulite. Amostra controle positivo (C) CC 192 (amplificações: *felA* [270 pb], *iutA* [300 pb] e *cvaC* [680 pb]).

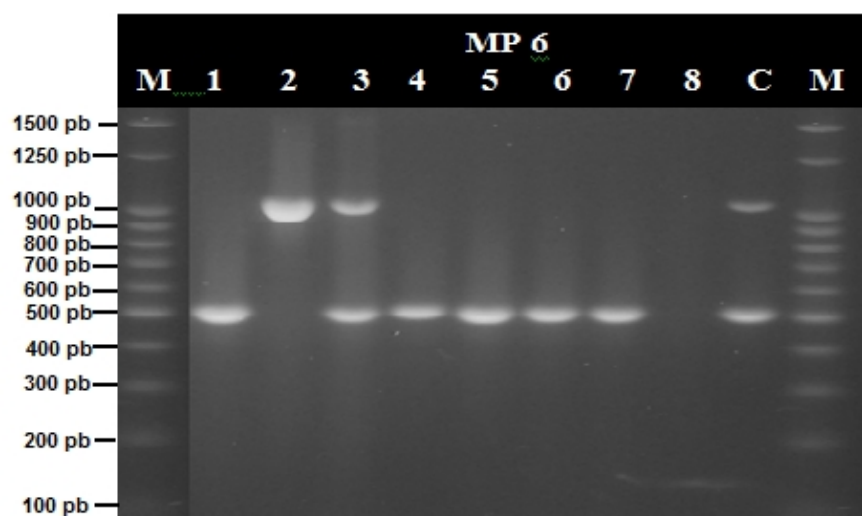


Figura 6 – Produtos de amplificação de um ensaio de multiplex-PCR (MP6), amplificados separadamente usando conjunto de *primers*. Legenda: M: Marcador de peso molecular de 100 pb. MP 6: 1 à 8 são amostras APEC isoladas de lesões de celulite. Amostra controle positivo (C) CC 158 (amplificações: *papG* [508 pb] e *fimH* [1070 pb]).

4.1.3 Distribuição dos genes associados à virulência

O conjunto de genes associados à virulência encontrado com maior frequência, foram os genes responsáveis por adesão, como *crl* (96,11%), *fimC* (95,70%), *fimH*

(92,02%) e genes responsáveis pela resistência sérica, como *ompA* (94,68%) e *traT* (88,75%). A frequência de todos os genes encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2: Frequência dos genes associados à virulência encontrados nas 489 amostras de *E. coli* isolada de aves

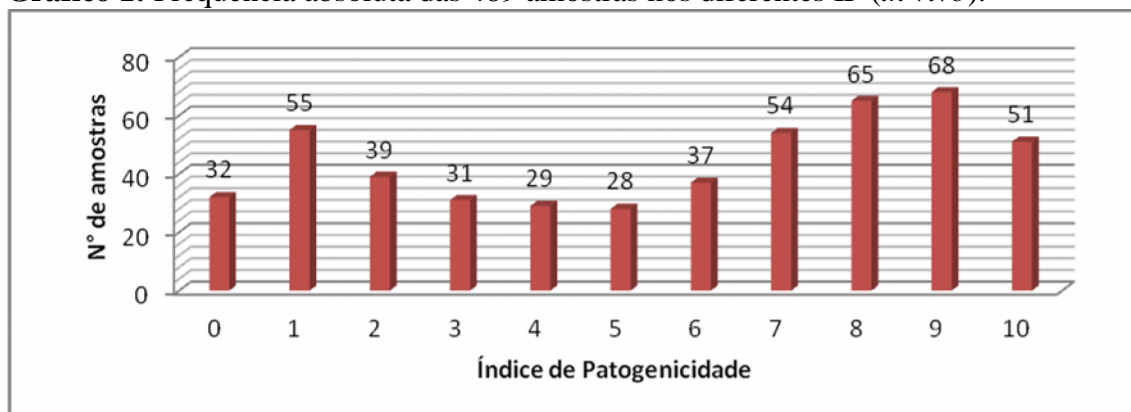
Função / Gene	Característica	Amostras de <i>E. coli</i> n=489 (%)
Adesinas		
<i>crl</i>	Fimbria “curli” (regurador)	470 (96,11)
<i>fimC</i>	Fimbria tipo 1 (Adesina D-manose-específica)	468 (95,70)
<i>fimH</i>	Fimbria do tipo 1	450 (92,02)
<i>Mat</i>	Fimbrias associadas a Meningite e regulação da temperatura	413 (84,46)
<i>tshu</i>	Proteína Tsh - Hemaglutinina sensível a temperatura	204 (41,72)
<i>hra</i>	Agglutinina resistente ao calor	188 (38,44)
<i>papC</i>	Pilus associado com pielonefrite	124 (25,36)
<i>papG</i>	Fimbria P ou F 11	57 (11,65)
<i>iha</i>	Gene homólogo-ferro-regulado	45 (9,20)
<i>afa/draB</i>	Adesina afimbrial (operon) / Dr adesina antígeno-específica	33 (6,75)
<i>felA</i>	Codificadora da fimbria 11	25 (5,11)
<i>sfa/focC</i>	Fímbria S (operon) - ácido siálico específicos - e fímbrias FICD	8 (1,63)
Invasão		
<i>cvaC</i>	Produção de colicina	237 (48,46)
<i>ibeA</i>	Proteína de Invasão do endotélio cerebral de <i>E. coli</i>	135 (27,61)
<i>tia</i>	Invasão de Locus toxigênicos em ETEC	121 (24,74)
<i>gimB</i>	Ilha genética associada com a meningite neonatal	80 (16,36)
Aquisição de ferro		
<i>iucD</i>	Aerobactina (Síntese)	341 (69,73)
<i>ironA</i>	Catecolatos sideróforos (salmochelin)	330 (67,48)
<i>chuA</i>	Gene da proteína Heme (transporte) da EHEC	319 (65,23)
<i>iutA</i>	Presença de aerobactina: captação e transporte de ferro	318 (65,03)
<i>sitD ep.</i>	Gene do sistema de transporte de ferro da <i>Salmonella</i>	318 (65,03)
<i>ireA</i>	Elemento ferro-responsivo	244 (49,89)
<i>irp2</i>	Aerobactina (repressor) - Proteína ferro repressor (síntese yersiniabactin)	221 (45,19)
<i>fyuA</i>	Aerobactina - Férrico captação de Yersinia (receptor yersiniabactin)	161 (32,92)
<i>sitD chr</i>	Gene do sistema de transporte de ferro da <i>Salmonella</i>	140 (28,63)
Resistência sérica		
<i>ompA</i>	Proteína da membrana externa	463 (94,68)
<i>traT</i>	Proteína de transferência	434 (88,75)
<i>iss</i>	Aumento da sobrevivência sérica	346 (70,75)
<i>kpsMT II</i>	Antígeno capsular do Grupo II	309 (63,19)
<i>cvi/cva</i>	Gene estrutural do operon do plasmídeo ColV	245 (50,10)
<i>neuC</i>	Polissacarídeo capsular K1	115 (23,51)
Toxinas		
<i>astA</i>	EAST1 (calor estável associado a citotoxina de <i>E. coli</i> enteroagregativa)	226 (46,21)
<i>sat</i>	Toxina autotransportadora secretada	133 (27,20)
<i>vat</i>	Toxina autotransportadora que induz formação de Vacuolos	103 (21,06)
<i>hlyA</i>	Hemolisina A	28 (5,72)
<i>cnf1/2</i>	Fator necrosante citotóxico	14 (2,86)
Outros		
<i>malX = Rpai</i>	Ilha de patogenicidade associada ao marcador CFTO 73	98 (20,04)
<i>pic</i>	Protease Serina Autotransportadora	82 (16,77)

As amostras de *E. coli* utilizadas neste estudo apresentaram de 3 a 30, dos 38 genes de virulência investigados, com uma média de 16,45 genes por isolado. Em 99,59% (487) dos isolados foi detectado pelo menos um fator relacionado à adesão (*afa/draB*, *crl*, *fimC*, *fimH*, *hrlA*, *iha*, *papC*, *papG*, *sfa/focC*, *tsh*, *mat* e *felA*); em 77,30% (378) dos isolados foi detectado pelo menos um fator relacionado à invasão (*gimB*, *ibeA*, *tia* e *cvaC*); em 96,73% (473) dos isolados foi detectado pelo menos um fator relacionado a aquisição de ferro (*chuA*, *fyuA*, *ireA*, *ironA*, *irp2*, *iucD*, *sitD chr*, *sitD ep* e *iutA*); 99,79% (488) dos isolados foi detectado pelo menos um fator relacionado à resistência sérica (*cvi/cva*, *iss*, *neuC*, *kpsMT II*, *ompA* e *traT*); em 74,64% (365) dos isolados foi detectado pelo menos um fator relacionado à produção de toxinas (*astA*, *cnf1/2*, *sat*, *vat* e *hlyA*).

4.1.4 Índice de Patogenicidade (*in vivo*)

A frequência absoluta das 489 amostras nos diferentes IP (*in vivo*) encontram-se no Gráfico 1.

Gráfico 1: Frequência absoluta das 489 amostras nos diferentes IP (*in vivo*).



4.2 Significância estatística entre os genes associados à virulência

Afim de, analisar a associação entre os genes realizou-se o teste estatístico ² (Tabela 3).

Tabela 3: Porcentagem das amostras albergando ambos os genes (489 *E. coli*)

	<i>cri</i>	<i>ireA</i>	<i>cnf1/2</i>	<i>tia</i>	<i>sat</i>	<i>fyuA</i>	<i>mat</i>	<i>sfa</i>	<i>malX</i>	<i>afa</i>	<i>neuC</i>	<i>iha</i>	<i>hriA</i>	<i>fimC</i>	<i>pic</i>	<i>hlyA</i>	<i>kpsMT</i>	<i>sttD ep</i>	<i>ompA</i>	<i>iroN1</i>	<i>gimB</i>	<i>sttD chr</i>	<i>traT</i>	<i>ibeA</i>	<i>chuA</i>	<i>vai</i>	<i>tsh</i>	<i>iucD</i>	<i>cvi/cva</i>	<i>papC</i>	<i>irp2</i>	<i>iss</i>	<i>astA</i>	<i>felA</i>	<i>iutA</i>	<i>cvaC</i>	<i>papG</i>	<i>fimH</i>				
<i>cri</i>																																										
<i>ireA</i>	47,44																																									
<i>cnf1/2</i>	2,65	0,81																																								
<i>tia</i>	24,53*	12,67	1,02																																							
<i>sat</i>	27,19**	9,61**	0,81	8,38																																						
<i>fyuA</i>	31,08	23,51**	2,04**	7,56	4,90**																																					
<i>mat</i>	82,41**	41,71	2,65	22,49*	25,97**	30,87**																																				
<i>sfa</i>	1,22**	0,81	0,2	1,02*	0,2	1,43**	1,43																																			
<i>malX</i>	19,42	10,02	1,43**	5,31	5,11	11,24**	19,22**	1,02**																																		
<i>afa</i>	6,74	2,82	0,41	3,27**	2,86*	1,22	6,13	0	2,04																																	
<i>neuC</i>	22,08	11,24	1,02	6,74	5,52	11,86**	21,26*	1,02**	11,65**	2,65*																																
<i>iha</i>	9,2	7,56**	0,2	4,08**	2,65	3,27	8,38	0,2	1,22	0,4	2,65**																															
<i>hriA</i>	36,8	26,17**	0,41	11,65*	9,4	14,72*	33,33	0,81	6,95	2,24	9,4	6,74**																														
<i>fimC</i>	92,22	47,44	2,65	23,92	25,76	32,31	82,20**	1,63	19,63	6,33	22,9	8,58	36,4																													
<i>pic</i>	15,13**	14,51**	0,2	4,49	1,43	10,83**	12,67*	0,2	1,84*	1,02	3,27	0,81	7,56	16,35																												
<i>hlyA</i>	5,72	2,24	0,2	2,25	2,45	0,41**	5,11	0	1,43	1,43	2,04	0,4	1,22	5,31	0,4																											
<i>kpsMTII</i>	61,14	36,40**	2,65*	18,61**	18,2	23,92**	56,23**	1,43	18,20**	5,72**	17,79**	6,33	26,17	60,94	10,22	4,70*																										
<i>SitD ep</i>	62,78	38,24**	2,04	15,13	19,63*	25,15**	57,66**	1,22	13,9	3,68	15,74	6,54	25,76	62,98	12,47	2,65*	44,37**																									
<i>ompA</i>	91,41*	47,24	2,65	23,31	26,99**	31,49	83,02**	1,63	19,22	6,54	22,49	8,58	36,19	91,61**	15,33	5,31	60,12	65,03**																								
<i>ironN1</i>	65,03	39,05**	1,84	14,11**	19,22	26,58**	60,53**	1,63*	15,74**	4,08	16,76	5,31	25,97	65,43*	12,47	3,27	45,60**	57,46**	66,66**																							
<i>gimB</i>	15,95	9,61	0,61	5,72*	5,93*	6,13	14,92	0,61**	5,31	1,84	5,93**	1,63	7,36	16,15	1,43*	1,43	13,49**	10,02	15,74	10,83																						
<i>sttD chr</i>	28,01	14,72	1,63*	10,02**	8,58	11,86*	27,19**	1,02*	11,24**	2,86	11,04**	3,06	11,45	28,42*	1,84**	1,63	22,69**	19,42	27,81	19,63	8,99**																					
<i>traT</i>	85,48	46,42**	2,25	22,9	24,53	30,26	75,86	1,43	18,4	5,72	22,08*	8,99*	35,37	85,88**	14,92	5,31	57,46*	59,30*	84,25	61,75**	14,31	25,35																				
<i>ibeA</i>	25,97	15,33	2,04**	7,15	6,13	14,52**	23,51	0,81	9,81**	1,22	11,04**	2,45	10,22	26,58	3,88	1,43	20,85**	18,6	25,56	19,22	5,93	14,31**	25,35																			
<i>chuA</i>	62,57	37,42**	2,45	18,81**	17,38	27,19**	57,46**	1,02	14,92*	5,11	17,79**	6,54	26,58	62,98	13,08**	3,88	44,17**	42,94	61,34	41,92*	12,67*	22,69**	58,89	23,10**																		
<i>vai</i>	19,83	16,56**	0,81	5,52	1,43**	15,13**	18,4	1,22**	5,72*	1,22	7,56**	1,63	8,17	20,85	9,40**	0,61	14,11	16,97**	20,65	17,38**	4,49	6,33	18,6	5,72	16,97**																	
<i>tsh</i>	40,49	28,63**	1,63	10,02	9,61	19,22**	36,19	1,43**	8,17	2,86	11,24	4,9	17,99	39,87	8,79*	2,45	27,81	32,92**	40,69*	36,40**	7,97	12,06	38,85**	12,06	29,85*	13,08**																
<i>iucD</i>	67,07	42,53**	2,45	18,61	18,6	29,03**	61,75**	1,22	14,51	3,68	15,74	7,36	28,83	67,68*	14,51**	3,47	47,44**	53,37**	67,89**	54,19**	11,86	20,44	63,39*	19,83	48,87**	18,60**	38,03**															
<i>cvi/cva</i>	48,05	29,65**	1,02	11,65	12,47	20,65**	44,37*	1,43*	12,26*	2,45*	13,29	3,68	20,65	48,67	10,63**	2,65	34,96	39,67**	48,67*	43,35**	9,2	15,95	44,58	14,51	30,06*	12,06	24,33**	41,71**														
<i>papC</i>	24,13	15,54**	0,2	11,04**	6,95	6,74	21,47	0,61	3,88	2,45	4,29*	4,70**	12,06*	2,45	6,33**	1,43	16,35	15,13	24,33	14,31**	4,9	6,74	22,49	4,70**	16,76	5,72	10,42	19,83*	14,51													
<i>irp2</i>	42,33*	14,92**	2,45**	9,61	6,33**	28,22**	37,83	1,02	10,83*	1,84*	13,49**	4,49	19,63*	43,76	12,06*	1,43*	31,08	33,53**	42,53	35,17**	6,95	13,29	41,3	16,97**	35,58**	17,17**	25,76**	37,21**	26,17**	10,02												
<i>iss</i>	68,3	39,46**	2,25	16,97	20,04	26,58**	61,55*	1,43	14,92	3,88	16,35	6,13	30,06**	67,89	13,49*	3,68	46,21	55,21**	68,09*	58,48**	11,04	20,04	63,8	20,04	43,55*	17,17**	34,96**	55,41**	41,92**	17,79	34,35*											
<i>astA</i>	45,19	24,53	2,04	13,49*	12,26	16,15	40,28	1,02	10,42	3,06	11,45	4,7	19,22	43,76	5,72*	2,65	33,94**	29,03	43,14	30,06	8,79	16,35**	41,71	14,51	33,53**	8,99	19,42	32,1	21,47	12,26	21,26	32,31										
<i>felA</i>	4,9	3,47	0,2	2,45**	2,45*	2,25	4,29	0	0,4	0,81	1,02	0,61	2,86	4,9	2,04**	0,4	2,86	3,88	4,08	3,68	1,02	0,81	5,11	0,61	4,08	1,43	1,84	4,08	3,27	3,47**	2,65	4,29	2,04									
<i>iutA</i>	61,55*	40,90**	1,02*	16,15	14,72**	26,38**	55,01	1,02	13,08	2,24**	14,72	7,15	27,60*	62,57	14,31**	2,45*	44,78**	48,87**	62,16	50,92**	9,81	17,38	60,12**	17,38	42,12	16,35**	34,35**	55,82**	38,03**	16,35	35,99**	51,32**	28,62	3,47								
<i>cvaC</i>	45,6*	30,87**	0,41**	9,40**	7,36**	21,47**	39,67	1,22	11,45	0,81**	13,08	3,88	19,42	47,23	11,45**	1,43*	32,1	37,21**	46,62	41,10**	7,36	11,86*	44,17	13,29	29,24*	13,29**	26,38**	39,67**	36,19**	11,24	28,83**	40,08**	19,42**	1,63	44,37**							
<i>papG</i>	11,24	8,17**	0,2	7,15**	2,04	3,68	8,79*	0	1,43	0,81	1,02**	3,06**	6,54**	11,04	3,27*	0,4	6,74	7,97	11																							

4.3 Redes Neurais Artificiais

Duas redes neurais artificiais foram construídas, a primeira rede (rede A) utilizava todas as amostras disponíveis para o estudo e a segunda rede (rede B) foi construída com 28 amostras por IP, escolhidas aleatoriamente. A finalidade de construir a segunda RNA foi analisar como se comportariam os resultados se a camada de saída recebesse o mesmo número de amostras para cada IP (28 amostras), desta forma a “rede A” foi construída com 489 amostras e a “rede B” com 308 amostras.

Para um melhor entendimento do modelo apresentado, determinamos sensibilidade à “relação de positivos verdadeiros” e especificidade à “relação de negativos verdadeiros”. Os resultados encontrados em nosso estudo foram os seguintes: a “rede A” apresentou uma classificação correta de 91,62%, uma especificidade superior a 97,15% e uma sensibilidade superior a 81,54% em todas as categorias respectivamente (Figura 7); já a “rede B” apresentou uma classificação correta de 99,03%, uma especificidade superior a 99,64% em todas as categorias e uma sensibilidade, em 9 das 11 categorias, de 100% e para os IP 2 e IP 10, uma sensibilidade de 96,43% e 92,86%, respectivamente (Figura 8).

General statistics:		Advanced...		Rows classified correctly:	448	91.62%	A						
<input type="checkbox"/> Enhanced generalization				Rows classified incorrectly:	41	8.38%	B						
Rows processed:		489		Rows not classified:	0	0.00%							
Agreement Matrix (Contingency Table) Statistics:													
	Actual '0'	Actual '1'	Actual '10'	Actual '2'	Actual '3'	Actual '4'	Actual '5'	Actual '6'	Actual '7'	Actual '8'	Actual '9'	Total	Positive Predictive Value
Classified as '3'	0	1	0	1	30	0	0	0	0	0	0	32	93.75%
Classified as '4'	0	0	0	0	0	28	0	1	0	0	0	29	96.55%
Classified as '5'	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	28	100.0%
Classified as '6'	0	0	1	0	0	0	0	35	3	0	1	40	87.5%
Classified as '7'	0	0	1	0	0	0	0	0	45	3	1	50	90.0%
Classified as '8'	0	1	1	1	0	0	0	1	0	53	2	59	89.83%
Classified as '9'	0	2	0	0	1	0	0	0	3	6	64	76	84.21%
Total	32	55	51	39	31	29	28	37	54	65	68	489	
True-pos. ratio	1.0	0.8909	0.9412	0.9231	0.9677	0.9655	1.0	0.9459	0.8333	0.8154	0.9412		
False-pos. ratio	0.0044	0.0046	0.0114	0.0022	0.0044	0.0022	0.0	0.0111	0.0115	0.0142	0.0285		
True-neg. ratio	0.9956	0.9954	0.9886	0.9978	0.9956	0.9978	1.0	0.9889	0.9885	0.9858	0.9715		
False-neg. ratio	0.0	0.1091	0.0588	0.0769	0.0323	0.0345	0.0	0.0541	0.1667	0.1846	0.0588		
Sensitivity	100.0%	89.09%	94.12%	92.31%	96.77%	96.55%	100.0%	94.59%	83.33%	81.54%	94.12%		C
Specificity	99.56%	99.54%	98.86%	99.78%	99.56%	99.78%	100.0%	98.89%	98.85%	98.58%	97.15%		D

Figura 7 – Resultados apresentados pela “rede A”. Legenda: (A) Amostras classificadas corretamente; (B) Amostras classificadas incorretamente; (C) Sensibilidade; (D) Especificidade

General statistics:													
<input type="checkbox"/> Enhanced generalization	Advanced...		Rows classified correctly:		305	99.03%							A B
Rows processed: 308			Rows classified incorrectly:		3	0.97%							
			Rows not classified:		0	0.00%							
Agreement Matrix (Contingency Table) Statistics:													
	Actual '0'	Actual '1'	Actual '10'	Actual '2'	Actual '3'	Actual '4'	Actual '5'	Actual '6'	Actual '7'	Actual '8'	Actual '9'	Total	Positive Predictive Value
Classified as "4"	0	0	1	0	0	28	0	0	0	0	0	29	96.55%
Classified as "5"	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	28	100.0%
Classified as "6"	0	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	28	100.0%
Classified as "7"	0	0	1	0	0	0	0	0	28	0	0	29	96.55%
Classified as "8"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	0	28	100.0%
Classified as "9"	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28	28	100.0%
Total	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	308	
True-pos. ratio	1.0	1.0	0.9286	0.9643	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
False-pos. ratio	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0036	0.0036	0.0	0.0	0.0036	0.0	0.0		
True-neg. ratio	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9964	0.9964	1.0	1.0	0.9964	1.0	1.0		
False-neg. ratio	0.0	0.0	0.0714	0.0357	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
Sensitivity	100.0%	100.0%	92.86%	96.43%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%		C
Specificity	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	99.64%	99.64%	100.0%	100.0%	99.64%	100.0%	100.0%		D

Figura 8 – Resultados apresentados pela “rede B”. Legenda: (A) Amostras classificadas corretamente; (B) Amostras classificadas incorretamente; (C) Sensibilidade; (D) Especificidade

5 DISCUSSÃO

Os ensaios da PCR permitiram a caracterização molecular dos fatores associados à virulência das *E. coli* de origem aviária. Foram utilizados os resultados dos testes de motilidade e testes de patogenicidade *in vivo* de cada amostra para a construção de uma RNA que fosse capaz de prever a patogenicidade da *E. coli* com a máxima precisão possível. Neste trabalho, observou-se que 73,82% das amostras de *E. coli* foram móveis, corroborando com Tiba *et al.* (2009) e também foi encontrado muitas associações entre a presença de um gene com a presença de outro, resultados também relatados por Ewers *et al.* (2007), porém, ainda não se sabe a importância dessas relações para a *E. coli* ocasionar a doença.

A dificuldade que envolve a *E. coli* está na classificação desta como patogênica, visto que a diferenciação entre cepas patogênicas e apatogênicas continua sendo um problema após o diagnóstico bacteriológico. Provavelmente isso ainda acontece devido à complexidade das interações que existem entre os fatores de virulência das *E. coli* e ao fato dos procedimentos convencionais para a determinação da patogenicidade das *E. coli*, nos quais se inoculam animais, serem demorados, caros e eticamente questionados pela comunidade internacional (SALLE *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de estratégias de diagnóstico rápido para cepas APEC através da detecção de genes associados à virulência são assuntos discutidos na comunidade internacional. Johnson *et al.* (2008) através da pesquisa de genes associados a virulência elaboraram uma ferramenta de diagnóstico rápido para diferenciar cepas APEC de amostras de *E. coli* fecais comensais (AFEC), identificando cinco genes (*iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN* e *ompT*) como sendo os mais associados com esse grupo de bactérias. Entretanto, apesar de forte diferença na distribuição desses genes entre APEC e AFEC, muitos genes estudados podem ser encontrados em ambas as populações. Nesta mesma linha de pesquisa, Schouler *et al.* (2012) identificaram quatro diferentes associações de genes de virulência capazes de identificar 70,2% das amostras APEC patogênicas, sendo uma outra ferramenta de diagnóstico capacitada nessa identificação.

As Redes Neurais Artificiais (RNAs) já estão sendo aplicadas em uma enorme quantidade de áreas, entretanto, existem campos que o uso dessa ferramenta é ainda escasso, esse é o caso da ciência animal. Segundo Arbid (2003), a falta de aplicação das RNAs na ciência animal é muito paradoxal, pois nessa área existe uma grande

quantidade de dados e atualmente as RNAs veem se apresentando como um método de análise mais poderoso do que métodos estatísticos clássicos. O CDPA há alguns anos vem demonstrando a facilidade e utilidade desta ferramenta dentro do setor avícola, aplicando-a na produção animal e na sanidade.

Rocha (2006) iniciou as primeiras pesquisas envolvendo *E. coli* de origem aviária e redes neurais artificiais. Essa pesquisadora utilizou as RNAs para a mesma finalidade que essa dissertação, “predizer a patogenicidade de amostras de *E. coli* oriundas do setor avícola”. A mesma, construiu três RNAs, as quais foram “alimentadas” por dados de 293 *E. coli*. As redes construídas por Rocha (2006) apresentavam uma camada de entrada formada por sete genes associados à virulência (*papC*, *felA*, *cvaC*, *iutA*, *iss*, *tsh* e *kpsII*), motilidade e origem das amostras (colisepticemia, celulite e cama de aviário), com uma camada de saída formada pelo IP (SOUZA, 2006). Os primeiros resultados (rede 1) encontrados nesta pesquisa determinaram a construção de outras duas RNAs (rede 2 e 3), as quais diferenciavam-se pela forma de apresentação dos dados na camada de saída. A rede 1 foi formada pelos IPs de 0 (zero) à 10 (dez) na camada de saída e apresentou uma classificação correta de 54,27%, desta forma, como Rocha (2006) relata em seu trabalho, “a melhor precisão dos modelos gerados sempre foi buscada”, reduziu-se para três (rede 2) e para dois (rede 3) o número de categorias na camada de saída. Com isso, agrupou-se amostras com IPs de 0 (zero) à 3,99, nomeando-as como apatogênicas-patogenicidade baixa (AP/PB), amostras com IP de 4 à 6,99, nomeando-as como patogenicidade intermediária (PI) e amostras com IP de 7 à 10 como patogenicidade alta (PA) e o resultado desta rede (rede 2) foi de 80,55% de acerto. A última rede recebeu dois agrupamentos, amostras com IPs de 0 à 3,99 (AP/PB) e amostras com IPs de 4 à 10 nomeadas como cepas patogênicas, e apresentou uma classificação correta de 83,96%.

Segundo Kominakis *et al.* (2002), o desempenho de uma rede pode ser melhorado com a utilização de um conjunto maior de dados na fase de treinamento, possibilitando direcionar os parâmetros específicos de treinamento e permitindo melhor qualidade da predição. Desta forma, o presente trabalho buscou melhorar ainda mais as RNAs produzidas por Rocha (2006), aumentando o banco de amostras para 489 *E. coli* e para 38 genes de virulência pesquisados. Os resultados das duas RNAs construídas, corroboraram com Kominakis *et al.* (2002), pois as duas redes apresentaram uma melhora no desempenho sem que necessite-se fazer agrupamentos na camada de saída, e com isso, a rede B, por apresentar uma classificação correta de 99,03%, tornou-se uma

ferramenta poderosa, classificando a patogenicidade de amostras de *E. coli* de 0 (zero) à 10 (dez) sem a necessidade de um teste biológico, como a inoculação em pintinhos.

No Brasil, em 2008 foi aprovada a Lei 11.794, regulamentada pelo Decreto 6.899, em 15/7/2009, estabelecendo a implantação do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e as CEUAS (Comissões de Ética no Uso de Animais), os procedimentos e as responsabilidades para uso de animais de laboratório (Brasil, [2008]). Segundo a FIOCRUZ (2008), ainda não é possível substituir o uso de animais em todas as áreas, mas métodos alternativos podem ser usados, desde que estes já se encontrem validados, impedindo que animais sejam usados de forma equivocada.

Atualmente os estudos com *E. coli* estão voltados para as pesquisas associadas à genes de virulência (OLSEN *et al.*, 2012; JEONG *et al.*, 2012; OH *et al.*, 2012; KANSAL *et al.*, 2013), analisando a frequência, a interação e a comparação desses fatores entre diferentes patotipos de *E. coli*, uma realidade que hoje suporta as hipóteses de que subgrupos APEC podem ser considerados agentes com potencial zoonótico (EWERS *et al.*, 2007). Zhao *et al.* (2009) também relatou essa hipótese comparando fatores de virulência e a expressão de genes específicos entre UPEC e APEC em modelo de infecção do trato urinário murino e modelo de desafio em pintinhos. Esses pesquisadores observaram que vários genes UPEC e APEC mostraram uma similar tendência de expressão em ambos os modelos e baseado nesses resultados, o potencial para APEC agir como UPEC humanas ou como um reservatório de genes de virulência para UPEC deve ser considerado.

No ano de 2011, na Alemanha, um surto de *E. coli* oriundas de brotos de feijão causou pelo menos a morte de 50 pessoas (MORIEL *et al.*, 2012) e as perdas econômicas foram severas aos produtores de vegetais, cujas vendas foram dizimadas pelo surto desta bactéria (CHEUNG *et al.*, 2011). No excremento das aves, há aproximadamente 10^6 UFC de *E. coli*, por gramas de fezes, das quais de 0-15% são de sorogrupos patogênicos (GROSS, 1994). É neste sentido que o acompanhamento da patogenicidade da *E. coli* dentro do aviário cresce em importância e torna-se imprescindível. Ao somar os vários quadros patológicos causados por cepas APEC aos possíveis problemas com saúde pública, a *E. coli* pode também trazer perdas enormes para a avicultura mundial.

As RNAs construídas neste trabalho se revestem de importância quando confrontamos com a rotina vivida pelos médicos veterinários que atuam no campo, na qual, em geral, só lhes é oferecida a informação do nome da bactéria e eventualmente,

um antibiograma nos exames laboratoriais. Assim sendo, o arsenal tecnológico representado pela biologia molecular, neste caso as provas de PCR, fica retido nas fronteiras dos laboratórios e não tem representado uma ferramenta útil para o trabalho no campo. Adiciona-se a resistência, cada vez maior, ao uso de animais experimentais e problemas com saúde pública e o quadro se completa. Portanto, o oferecimento de um método de suporte às decisões dos médicos veterinários avícolas, que acompanhe a flutuação da patogenicidade desta bactéria dentro do aviário, trará reflexos na relação custo/benefício dos tratamentos medicamentosos, principalmente na redução da resistência a antimicrobianos, resíduos destas drogas nas carnes e ovos e produção de um alimento mais seguro para o consumidor.

6 CONCLUSÃO

Ao atingir percentuais de classificação corretas acima de 99%, o método aqui proposto conseguiu realizar a predição, de zero à dez, da patogenicidade das amostras de *E. coli* de origem aviária. As características do modelo permitem a classificação com ótimo grau de confiabilidade, de acordo com a sensibilidade e a especificidade. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram plenamente alcançados.

REFERÊNCIAS

ANDREATTI FILHO, R. L.; **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, p. 2-133, 2007.

ANTÃO, E. M. *et al.*; The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Microbial Pathogenesis**. V. 45, issues 5-6, p. 361-369. 2008.

ANTÃO, E. M.; WIELER, L. H.; EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**, London, v.1, n. 22, p. 1-12, Dec. 2009.

ARBIB, M. The handbook of brain theory and neural networks. Cambridge, MA, **Massachusetts Institute of Technology**, 2003.

ASK, B. *et al.* Defining susceptibility of broiler chicks to colibacillosis. **Avian Pathology**. 35: 147-153. 2006.

BARBIERI, N. *et al.* Characterization of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolated from a Peacock (*Pavo cristatus*) with Colisepticemia. **Avian Diseases**. Kennett Square, v. 56, p. 436-440, 2012.

BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. P. Colibacillosis. In: Calnek, B. D. (Ed.) **Diseases of poultry**. 12th ed. Ames: University Press, p. 691-738, 2008.

BASTOS, E. N. F.; Uma Rede Neural Auto-Organizável Construtiva para Aprendizado Perpétuo de Padrões Espaço-Temporais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Informática. Programa de Pós-Graduação em Camuflagem. **Dissertação**. Porto Alegre, 2007.

BAUCHART, P. *et al.*; Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* e Search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. **Microbial Pathogenesis**. v. 49. p. 105 e 115. 2010.

BERCHIERI JR, A. *et al.* **Doença das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1.104 p., 2009.

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.

BRANCO, J.A.D. Manejo pré-abate e perdas decorrentes do processamento de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Campinas, **Anais...Campinas : FACTA**, v.2, p.129-142, 2004.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Brasília [2008]. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/lei/11794.htm >. Acesso em: 12 jan. 2013.

BRASIL. Presidência da República. **Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009**. Brasília [2008]. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm >. Acesso em: 12 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação**. Brasília, [2012]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>>. Acesso em: 06 dez. 2012.

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

CHEUNG, M. K. *et al.* German *Escherichia coli* O104:H4 outbreak: whole-genome phylogeny without alignment. **BMC Research Notes**, v. 4:533, p. 1-5, 2011.

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

DELICATO E.R. *et al.* Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 2, p. 97-103, 2003.

DEREE, J. M.; SCWILLENS, P.; VANDENBOSCH, J.F. Monoclonal-Antibodies that Recognize the P-Fimbriae F71, F72, F9 and F11 from Uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 50, n. 3, p. 900-904, 1985.

DE ROSA, M.; FICKEN, M.D.; BARNES, H.J. Acute airsacculitis in untreated and cyclophosphamide-pre treated broiler chickens inoculated with *Escherichia coli* or *Escherichia coli* cell free culture filtrate. **Veterinarian Pathology**, v.29, p. 68-78, 1992.

DE RYCKE, J., MILON, A.; OSWALD, E. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 2, n. 3, p. 221-33, 1999.

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

DOYLE, M. P.; SCHOENI, J. L.. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Appl. Environ. Microbiol.** v.53, p. 2394-2396, 1987.

DOZOIS, C. M.; FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J.; BOSSÉ, M.; pap-and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. **Infect Immune**. 60, p. 2648-56. 1992

EWERS, C. *et al.* Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 304-317, 2006.

EWERS, C. *et al.* Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 297, n. 3, p. 163-176, 2007.

FERNADES, A.; Inteligência Artificial: noções gerais. Florianópolis. **Ed. Visual Books**. p. 59-64, 2008.

FERNANDÉZ, C., *et al.* Neural networks for animal science applications: Two case studies. **Expert Systems with Applications**. V. 31. p. 444–450. 2006.

FERNEDA, E.; Redes neurais e sua aplicação em sistemas de recuperação de informação. **Ciência da Informação**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 25-30. 2006.

FERREIRA, T. Z. *et al.* Perdas econômicas das principais causas de condenações de carcaças de frangos de corte em Matadouros-Frigoríficos sob Inspeção Federal no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. Pub 40(1): 1021. 2012.

FERREIRA, A. J. & KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JR, *et al.* **Doença das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 197-205, 2009.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S., Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 61, n. 2, p. 136-169, June, 1997.

FIOCRUZ. Manual de Utilização de Animais. 1º edição. Jan. 2008.

GIBBS, P. S.; PETERMANN, S. R.; WOOLEY. Comparison of several challenge models for studies in avian colibacillosis. **Avian disease**. 48: 751-758. 2004.

GOMIS, S. M. *et al.* Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. **Avian Diseases**. V. 41, n.1, p. 234-240, 1997.

GROSS, W.G. Disease due to *Escherichia coli* in poultry. In: Gyles, C. L. (Ed.) **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Oxford: Cab International, p. 237-259. 1994.

GUASTALLI, E. A. L.; SOARES, N. M.; **Colibacilose Aviária**. Número 150. [2011] – Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=150> Capturado em: 28/12/12

GUYER, D. M. *et al.* Identification of *Sat*, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 53-66, Oct. 2000.

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

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C.; **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 219-230.

- HULL, R.A. *et al.* Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 33, p. 933-938, 1981.
- JANSSEN, T. *et al.* Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. **Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 291, n. 5, p. 371–378, 2001.
- JEONG, Y-W. *et al.* Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 13 (2), p. 145-152, 2012.
- JOHNSON, T. J. *et al.* Prevalence of Avian-Pathogenic *Escherichia coli* Strain O1 Genomic Islands among Extraintestinal and Commensal *E. coli* Isolates. **Journal of Bacteriology** p. 2846–2853. 2012
- JOHNSON, T. J. *et al.* Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. **Journal of clinical microbiology**, p. 3987–3996, dec. 2008.
- JOHNSON, T. J. *et al.* DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. **Journal Bacteriol.** v. 188, n. 2, p. 745–758. Jan. 2006.
- JOHNSON, J.R.; STELL, A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261–272, 2000.
- JOHNSON, J.R.; RUSSO T.A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 295, n. 6-7, p. 383-404, Oct. 2005.
- KANSAL, R. *et al.* Transcriptional Modulation of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Virulence Genes in Response to Epithelial Cell Interactions. **Infection and Immunity**, v. 81, n° 1, p. 259-270. 2013.
- KAPER, J.B., NATARO, J.P., MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-40. Feb. 2004.
- KARRER, D. *et al.* Redes neurais artificiais: conceitos e aplicações Profundão – IX Encontro de Engenharia de Produção da UFRJ. **Anais**. 2005.
- KEHL-FIE, T., GEME III, J.W.ST.; Identification and characterization of an RTX toxin in the emerging pathogen *Kingella kingae*. **Journal Bacteriol.** v. 189, n. 2, p. 430–436, Jan. 2007.
- KIM, K.S. Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 625–634. Aug. 2008.
- KIM, J.M. *et al.* Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. **Journal Clinical Investigation**, v. 102, p. 1815–1823, 1998.

KOMINAKIS, A.P. *et al.* A preliminary study of the application of artificial neural networks to prediction of milk yield in dairy sheep. **Computers and Eletronics in Agriculture**, v.35, p.35-48, 2002.

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

LANE M. C., *et al.* Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 16669-16674, 2007.

LATHAM, R.H.; STAMM, W.E. Role of fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections in adult women: correlation with localization studies. **The Journal of Infectious Diseases**, v.149. n.6, p.835-840. Jun. 1984.

LECLERC, B. *et al.*; Evaluation of the Adhesive Capacity of *Escherichia coli* Isolates Associated with Avian Cellulitis. **Avian Diseases**, vol. 47, N°. 1, p. 21-31, 2003.

LI, G., *et al.* Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature- tagged mutagenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5, p. 2818-2827. May, 2005.

LUDWIG JR., O.; MONTGOMERY, E.; Redes Neurais: fundamentos e aplicações com programas em C. Rio de Janeiro. **Ed. Ciência Moderna Ltda.** 2007

MARRETT, L. E. *et al.* Efficacy of neomycin sulfate water medication on the control of mortality associated with colibacillosis in growing turkey. **Poultry Science** 79:12 – 17. 2000.

MAURER, J.J. *et al.* The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**. Kennet Square, v. 42, n. 1, p. 106–118, 1998.

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, p. 536-540, 2003.

MÉNARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.28, n. 1, p. 43-60, 2002.

MINHARRO, S. *et al.* Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 111-117, 2001.

MOL, O. & OUDEGA, B.; Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology. Rev.** 19: p. 25-52., oct. 1996.

MONTGOMERY, R. D. *et al.* The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to various *in vitro* attributes. *Avian disease*. 49: 63-69. 2005.

MONTGOMERIE, J.Z. *et al.* Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. **Infection and Immunity**, Washington, v.46, n.3, p.835-838,1984.

MORAES, L. B.; Estabelecimento de uma nova metodologia para a avaliação da depleção linfóide folicular da bolsa de Fabrício através da análise digital de imagens e de redes neurais artificiais. 2008. **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MORIEL, D. G. *et al.* *Escherichia coli*: Great Diversity around a Common Core. **MBio**. v. 3 May/June, 2012.

NATARO, J. P., KAPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clin Microb Rev.** v. 11, p. 142-201, 1998.

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

NORTON, R.A. Avian cellulitis. **World's Poultry Science Journal**, v.53, p.337-49, 1997.

OH, J. Y. *et al.* The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to the presence of virulence-associated genes. **Poultry Science**. V. 91, p. 370–375. 2012.

OLIVEIRA, S.J. **Guia bacteriológico prático: microbiologia veterinária**. Canoas, RS: ULBRA, p. 104-107, 2000.

OLSEN, R. H.; CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M.; Comparative genomics of multiple plasmids from APEC associated with clonal outbreaks demonstrates major similarities and identifies several potential vaccine-targets. **Veterinary Microbiology** v. 158, p. 384–393, 2012.

PANDORF, H. *et al.* Uso de redes neurais artificiais para predição de índices zootécnicos nas fases de gestação e maternidade na suinocultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.3, p.676-681, 2011

PARK, B.; CHEN, Y. R.; NGUYEN, M.. Multispectral image analysis using neural network algorithm for inspection of poultry carcasses. **Journal of Engng. Research**, v. 69, p.351-363, 1998.

PARREIRA, V. R.; YANO, T. Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p.111–119. May 1998.

PARREIRA, V. R.; GYLES, C. L. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating

autotransporter toxin. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 9, p. 5087-5096, 2003.

PINTO, P. R. Uso de Redes Neurais Artificiais no gerenciamento de matadouros-frigaríficos de aves e suínos no Sul do Brasil. 2006. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

POURBAKHS, S.A. *et al.*; Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. **Microbial pathogenesis**. v. 22, June 1997.

POUTTU, R. *et al.* *matB*, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 16, p. 4727-4736. Aug. 2001.

PROVENCE, D. L.; CURTISS, R. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n.4, p. 1369-1380. Apr. 1994.

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**, Porto Alegre: Artmed, p. 197-208. 2005.

REALI, E. H. Utilização de redes inteligência artificial no gerenciamento da produção de frangos de corte. 2004. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P.; **Patologia Aviária**, Barueri, SP: Manole, p. 67-74 / p.129-136, 2009.

RIBEIRO, M. G. *et al.* De hambúrguer, leite e outros gêneros alimentícios à colite hemorrágica e síndrome urêmica-hemolítica. **Higiene alimentar**. v. 13, p. 88-97, 1999.

ROCHA, A. C. G. P. Utilização de Inteligência artificial (redes neurais artificiais) para classificação de patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte. 2006. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ROCHA, S. L. S. Detecção de fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de granjas avícolas do RS através do Multiplex-PCR. 2008. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

RODRIGUES-SIEK, K. E. *et al.* Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**. v. 151, n. 6, p. 2097-2110. 2005.

RODRIGUES-SIEK *et al.* Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**. v. 36. p. 241-256, 2005

RONDÓN, E. P. O.; MURAKAMI, A. E.; SAKUGUTI, E. S.; Modelagem computacional para a produção e pesquisa em avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Jan./Mar., vol.4, n°. 1. 2002.

ROUSH, W.B. *et al.* Probabilistic Neural Network prediction of ascites in broilers based on minimal invasive physiological factors. **Poultry Science**, 76, 1513-1516. 1997

RUSSEL, S. M. *et al.* The effect of airsacculitis on bird weights, uniformity, fecal contamination, processing errors, and populations of *Campylobacter* spp. and *Escherichia coli*. **Poultry Science**. 82: 1326-1331. 2003.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extra-intestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 5, p. 1753-1754. May 2000.

RUSSO, T. A.; CARLINO, U. B.; JOHNSON, J. R. Identification of a new ironregulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 69, n. 10, p. 6209–6216. Oct. 2001.

SABRI, M.; LE VEILLE, S.; DOZOIS, C. M. A *SitABCD* homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. **Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 745-758. Mar. 2006.

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., v.3, no. 3, p. 257-264, 2001.

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 artificial neural networks to estimate production variables of broilers breeders in the production phase. **British Poultry Science**. 44: 211-217. 2003.

SALLE, F.O. *et al.* 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. 2006.

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. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SALLE, C. T. P. *et al.* Use of Artificial Intelligence (Artificial Neural Networks) to classify the pathogenicity of *Escherichia coli* isolates from broilers. In: WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE, 60., 2011, Sacramento, **Proceedings...**, Sacramento: [s. n.], 2011.

SANTANA, A. P. *et al.* Causes of condemnation of carcasses from poultry in slaughterhouses located in State of Goiás, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.9, p.2587-2592, 2008.

SCHUBERT, S. *et al.* Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. **Infection and Immunity**. Oxford, v. 66, n. 2, p. 480–485, 1998.

SCHUBERT, S. *et al.* *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 70, n. 9, p. 5335-5337. Sep. 2002.

SEELEY, J. R., H. W.; VANDERMARK, P. J.; LEE, J. J. Microbes in action. A Laboratory Manual of Microbiology, 4^o ed. New York: W H. **Freeman and Company**, 1991.

SCHOULER C. *et al.* Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* Based on Four Patterns of Virulence Genes. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 1673–1678, 2012.

SMITH, H.W.; GYLES, C.L. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 3, p. 387-401. Dec. 1970.

SMYTH, C. J.; MARRON, M.; SMITH, S. G. J. Fimbriae of *Escherichia coli* in Domestic Animals as Humans. In: Gyles, C. L. (Ed.), **Cab International**, Oxford, p. 399-435, 1994.

SPOHR, A. Gerenciamento através de Redes Neurais Artificiais dos fenômenos que envolvem as atividades de produção de reprodutoras pesadas e do frango de corte, de um incubatório e de um abatedouro avícolas. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

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

SPURBECK, R. R. *et al.*; *Escherichia coli* Isolates That Carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* Efficiently Colonize the Urinary Tract. **Infect Immune**. vol. 80 n° 12 p. 4115-4122. 2012.

SUKUPOLVI, S.; O'CONNOR, D. TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 4, p. 331-341. Dec. 1990.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli* and human disease. In: SUSSMAN, M. ***Escherichia coli* mechanisms of virulence**. Cambridge: University Press, p. 3-48, 1997.

TIBA, M. E. *et al.* Study on virulence factors associated with biofilm formation and phylogenetic groupings in *Escherichia coli* strains isolated from patients with cystitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42(1), p. 58-62, 2009.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUN, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 271-276.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual. 2011 -2012**. Disponível em: < http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php>. Acesso em: 06 dez. 2012.

VANDEKERCHOVE, D. *et al.* Significance of interactions between *Escherichia coli* and respiratory pathogens in layer hen flocks suffering from colibacillosis-associated mortality. **Avian Pathology**. 33:298–302. 2004.

VIDOTTO, M. C. *et al.* Virulence factors of avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 34, n. 3, p. 531- 538. Jul – Sep. 1990.

VIEIRA, F.M.C.; SILVA, I.J.O.; BARBOSA FILHO, J.A.D. *et al.* Productive losses on broiler preslaughter operations: effects of the distance from farms to abattoirs and of lairage time in a climatized holding area. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.2471-2476, 2010.

WATT, S. *et al.* *Escherichia coli* strains from pregnant women and neonates: intraspecies genetic distribution and prevalence of virulence factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1929–1935, 2003.

WOODROW, G. C. *et al.*. Mutations affecting the citrate-dependente iron uptake system in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 133, n. 3, p. 1524-1526, 1978.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infection and Immunity**. Oxford, v. 64, n. 4, p. 1441–1445, 1996.

ZHAO, L. *et al.* Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**, v. 155, p. 1634–1644, 2009

APÊNDICE A – Função, genes alvos e características.

Função / Gene	Característica
Adesinas	
<i>afa/draB</i>	Adesina afimbrial (operon) / Dr adesina antígeno-específica
<i>crl</i>	Fimbria “curli” (regulador)
<i>fimC</i>	Fimbria tipo 1 (Adesina D-manose-específica)
<i>fimH</i>	Fimbria do tipo 1
<i>hra</i>	Aglutinina resistente ao calor
<i>iha</i>	Gene homologo-ferro-regulado
<i>papC</i>	Pilus associado com pielonefrite
<i>papG</i>	Fimbria P ou F 11
<i>sfa/focC</i>	Fímbria S (operon) - ácido siálico específicos - e fímbrias F1CD
<i>tsh</i>	Proteína Tsh - Hemaglutinina sensível a temperatura
<i>mat</i>	Fímbrias associadas a Meningite e regulação da temperatura
<i>felA</i>	Codificadora da fimbria 11
Invasão	
<i>gimB</i>	Ilha genética associada com a meningite neonatal
<i>ibeA</i>	Proteína de Invasão do endotélio cerebral de <i>E. coli</i>
<i>tia</i>	Invasão de Locus toxigênicos em ETEC
<i>cvaC</i>	Produção de colicina
Aquisição de ferro	
<i>chuA</i>	Gene da proteína Heme (transporte) da EHEC
<i>fyuA</i>	Aerobactina - Férnico captação de <i>Yersinia</i> (receptor yersiniabactin)
<i>ireA</i>	Elemento ferro-responsivo
<i>ironA</i>	Catecolatos sideróforos (salmochelin)
<i>irp2</i>	Aerobactina (repressor) - Proteína ferro repressor (síntese yersiniabactin)
<i>iucD</i>	Aerobactina (Síntese)
<i>sitD chr</i>	Gene do sistema de transporte de ferro da <i>Salmonella</i>
<i>sitD ep.</i>	Gene do sistema de transporte de ferro da <i>Salmonella</i>
<i>iutA</i>	Presença de aerobactina: captação e transporte de ferro
Resistência sérica	
<i>cvi/cva</i>	Gene estrutural do operon do plasmídeo ColV
<i>iss</i>	Aumento da sobrevivência sérica
<i>neuC</i>	Polissacarídeo capsular K1
<i>kpsMT II</i>	Antígeno cápsular do Grupo II
<i>ompA</i>	Proteína da membrana externa
<i>traT</i>	Proteína de transferência
Toxinas	
<i>astA</i>	EAST1 (Citotoxina termo estável associado a <i>E. coli</i> enteroagregativa)
<i>cnf1/2</i>	Fator necrosante citotóxico
<i>sat</i>	Toxina autotransportadora secretada
<i>vat</i>	Toxina autotransportadora que induz formação de Vacuolos
<i>hlyA</i>	Hemolisina A
Outros	
<i>pic</i>	Protease Serina Autotransportadora
<i>malX = Rpai</i>	Ilha de patogenicidade associada ao marcador CFTO 73

APÊNDICE B - Sequência de cada *primer* e fonte bibliográfica dos genes pesquisados.

Gene	Sequência do Primer (5'-3', s: sense; a: antissense)	Fonte do primer
<i>afa/draB</i>	s: TAAGGAAGTGAAGGAGCGTG a: CCAGTAACTGTCCGTGACA	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>crl</i>	s: TTTCGATTGTCTGGCTGTATG a: C TTCAGATT CAGCGTCGTC	Maurer <i>et al.</i> (1998)
<i>fimC</i>	s: GGGTAGAAAATGCCGATGGTG a: CGTCATTTTGGGGGTAAGTGC	Janssen <i>et al.</i> (2001)
<i>fimH</i>	s: TGCAGAACGGATAAGCCGTGG a: GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	Johnson, J. R. and Stell, A. L. (2000)
<i>hra</i>	s: TCACTTGCAGACCAGCGTTTC a: GTA ACTCACACTGCTGTCACCT	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>iha</i>	s: TAGTGCGTTGGGTTATCGCTC a: AAGCCAGAGTGGTTATTCGC	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>papC</i>	s: TGATATCACGCAGTCAGTAGC a: CCGGCCATATTCACATAAC	Janssen <i>et al.</i> (2001)
<i>papG</i>	s: CTGTAATTACGGAAGTGATTTCTG a: ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT	Johnson, J. R. and Stell, A. L. (2000)
<i>sfa/focC</i>	s: GTCCTGACTCATCTGAAACTGCA a: CGGAGA ACTGGGTGCATCTTA	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>tsh</i>	s: ACTATTCTCTGCAGGAAGTC a: CTTCCGATGTTCTGAACGT	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>mat</i>	s: TATACGCTGGACTGAGTCGTG a: CAGGTAGCGTCCGA ACTGTA	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>felA</i>	s: GGCAGTGGTGTCTTTTGGTG a: GGCCCAGTAAAAGATAATTGAACC	Johnson, J. R. and Stell, A. L. (2000)
<i>gimB</i>	s: TCCAGATTGAGCATATCCC a: CCTGTAACATGTTGGCTTCA	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>ibeA</i>	s: TGGAACCCGCTCGTAATATAC a: CTGCCTGTTCAAGCATTGCA	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>tia</i>	s: AGCGCTTCCGTCAGGACTT a: ACCAGCATCCAGATAGCGAT	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>cvaC</i>	s: CACACACAAACGGGAGCTGTT a: CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	Acesso ao Genbank X57525
<i>chuA</i>	s: GACGAACCAACGGTCAGGAT a: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	Clermont <i>et al.</i> (2000)
<i>fyuA</i>	s: GCGACGGGAAGCGATGACTTA a: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	Schubert <i>et al.</i> (1998)
<i>ireA</i>	s: ATTGCCGTGATGTGTTCTGC a: CACGGATCACTTCAATGCGT	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>ironA</i>	s: ATCCTCTGGTCGCTAACTG a: CTGCACTGGAAGAACTGTTCT	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>irp2</i>	s: AAGGATTCGCTGTTACCGGAC a: TCGTCGGGCAGCGTTTCTTCT	Schubert <i>et al.</i> (1998)

Gene	Seqüência do Primer (5'-3', s: sense; a: antisense)	Fonte do primer
<i>iucD</i>	s: ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC a: CCTGATCCAGATGATGCTC	Janssen <i>et al.</i> (2001)
<i>sitD chr</i>	s: ACTCCCATACACAGGATCTG a: CTGTCTGTGTCCGGAATGA	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>SitD ep.</i>	s: TTGAGAACGACAGCGACTTC a: CTATCGAGCAGGTGAGGA	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>iutA</i>	s: GGCTGGACATCATGGGAACTGG a: CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	Acesso ao Genbank X05874
<i>cvi/cva</i>	s: TCCAAGCGGACCCCTTATAG a: CGCAGCATAGTTCCATGCT	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>iss</i>	s: ATCACATAGGATTCTGCCG a: CAGCGGAGTATAGATGCCA	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>neuC</i>	s: GGTGGTACATTCGGGATGTC a: AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	Watt <i>et al.</i> (2003)
<i>kpsMT II</i>	s: GCGCATTTGCTGATACTGTTG a: CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	Acesso ao Genbank X53819
<i>ompA</i>	s: AGCTATCGCGATTGCAGTG a: GGTGTTGCCAGTAACCGG	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>traT</i>	s: GTGGTGCGATGAGCACAG a: TAGTTCACATCTTCCACCATCG	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>astA</i>	s: TGCCATCAACACAGTATATCC a: TCAGGTCGCGAGTGACGGC	Yamamoto and Echeverria(1996)
<i>cnf1/2</i>	s: TCGTTATAAAATCAAACAGTG a: CTTTACAATATTGACATGCTG	Ewers <i>et al.</i> (2004)
<i>sat</i>	s: TGCTGGCTCTGGAGGAAC a: TTGAACATTCAGAGTACCGGG	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>vat</i>	s: TCCTGGGACATAATGGTCAG a: GTGTCAGAACGGAATTGTC	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>hlyA</i>	s: GTCCATTGCCGATAAGTTT a: AAGTAATTTTTGCCGTGTTTT	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>pic</i>	s: ACTGGATCTTAAGGCTCAGG a: TGGAATATCAGGGTGCCACT	Ewers <i>et al.</i> (2007)
<i>malX</i>	s: GGACATCCTGTTACAGCGCGCA a: TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	Johnson, J. R. and Stell, A. L. (2000)

APÊNDICE C – Relação dos protocolos e o número de pares de bases (pb) de cada gene

Multiplex-PCR	Genes	Tamanho do fragmento
Multiplex 1 Ewers et al. (2001)	1 <i>kpsMT II</i>	280 pb
	2 <i>hlyA</i>	350 pb
	3 <i>pic</i>	409 pb
	4 <i>fimC</i>	477 pb
	5 <i>hra</i>	537 pb
	6 <i>iha</i>	609 pb
	7 <i>neuC</i>	676 pb
	8 <i>afa/draB</i>	810 pb
	9 <i>malX = Rpai</i>	922 pb
	10 <i>sfa/focC</i>	1242 pb
Multiplex 2 Ewers et al. (2001)	1 <i>chuA</i>	278 pb
	2 <i>ibeA</i>	342 pb
	3 <i>traT</i>	430 pb
	4 <i>sitD chr</i>	554 pb
	5 <i>gimB</i>	736 pb
	6 <i>ironA</i>	847 pb
	7 <i>ompA</i>	919 pb
	8 <i>SitD ep.</i>	1052 pb
Multiplex 3 Ewers et al. (2001)	1 <i>astA</i>	116 pb
	2 <i>iss</i>	309 pb
	3 <i>irp2</i>	413 pb
	4 <i>papC</i>	501 pb
	5 <i>cvi/cva</i>	598 pb
	6 <i>iucD</i>	714 pb
	7 <i>tsh</i>	824 pb
	8 <i>vat</i>	981 pb
Multiplex 4 Ewers et al. (2001)	1 <i>crl</i>	270 pb
	2 <i>ireA</i>	384 pb
	3 <i>cnf1/2</i>	446 pb
	4 <i>tia</i>	512 pb
	5 <i>sat</i>	667 pb
	6 <i>fyuA</i>	774 pb
	7 <i>mat</i>	889 pb
Multiplex 5 Rocha (2008)	1 <i>felA</i>	270pb
	2 <i>iutA</i>	300pb
	3 <i>cvaC</i>	680pb
Multiplex 6 (Dados não publicados)	1 <i>papG</i>	508pb
	2 <i>fimH</i>	1070pb