



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MATHEUS SILVA SANCHES

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DOS
FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS DE *Proteus mirabilis* ISOLADOS DE
CARCAÇAS DE FRANGO COM CELULITE**

MATHEUS SILVA SANCHES

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DOS
FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS DE *Proteus mirabilis* ISOLADOS DE
CARCAÇAS DE FRANGO COM CELULITE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Angelita Sampaio Baptista

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

SA194 Sanches, Matheus Silva.
Caracterização genotípica e fenotípica dos fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos de *Proteus mirabilis* isolados de carcaças de frango com celulite / Matheus Silva Sanches. - Londrina, 2019.
100 f. : il.

Orientador: Sérgio Paulo Dejato da Rocha.
Coorientador: Ana Angelita Sampaio Baptista.
Dissertação (Mestrado Profissional em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Risco zoonótico - Tese. 2. Multirresistência - Tese. 3. Celulite aviária - Tese. 4. ESBL - Tese. I. Rocha, Sérgio Paulo Dejato da . II. Baptista, Ana Angelita Sampaio . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

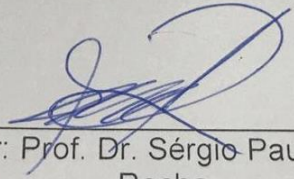
CDU 579

MATHEUS SILVA SANCHES

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE *Proteus mirabilis* ISOLADOS DE CARÇAÇAS DE FRANGO COM CELULITE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Alexandre Oba
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me sustentou e permitiu a conclusão deste curso, a minha mãe Cláudia e ao meu amigo Bruno que sempre me incentivaram e estiveram do meu lado durante toda a vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço.

Primeiramente a Deus por ter colocado em meus caminhos pessoas que sempre me inspiraram e incentivaram ao longo deste curso e na finalização do mesmo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha que me acolheu como seu orientado e me deu todo o suporte necessário, sempre muito prestativo e de prontidão a me ensinar e discutir sobre o nosso trabalho.

A minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Ana Angelita Sampaio Baptista por ter me acolhido como seu orientado e por todos os ensinamentos durante e após o experimento *in vivo*.

A Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi que também pode ser considerada a minha coorientadora por toda a ajuda na parte de resistência aos antimicrobianos.

A Prof^a. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo, a qual desenvolvi um enorme carinho, me ensinou valores além da microbiologia e tornou os meus dias no laboratório mais agradáveis.

A Prof^a. Dr^a. Eliana Carolina Vespero pelos antimicrobianos fornecidos.

A Prof^a. Dr^a. Ligia Carla Faccin Galhardi e as suas alunas Karoline e Daniele pelas culturas de células fornecidas.

Aos meus companheiros de laboratório por todos os momentos de descontração, risadas e ajuda nos experimentos, em especial a minha amiga Caroline, por todo o suporte e incentivo durante o processo seletivo do mestrado e após a minha aprovação, a qual compartilho amizade e conhecimento quase todos os dias.

A Prof^a. Dr^a. Ana Paula Bracarense pelo auxílio nas análises histopatológicas.

Ao Prof. Dr. Alexandre Oba e ao seu aluno João Antonio pelo auxílio na preparação da ração das aves.

A nossa querida técnica do laboratório de bacteriologia Claci pelo auxílio e amizade.

Ao meu amigo Erick Nishio pelo suporte durante o processo seletivo e ajuda com a análise estatística.

Às minhas companheiras do Laboratório de Medicina Aviária, Maysa, Marielen e Larissa por toda a ajuda durante o experimento *in vivo*. Sou muito grato por tê-las conhecido.

A CAPES pelo apoio financeiro concedido e à UEL, a qual tive a honra de ser aluno.

Ao meu amigo Luís por todo o companheirismo durante o mestrado, tornando os meus dias mais felizes. Você é luz amigo!!

Ao meu amigo Bruno que acompanha a minha vida acadêmica desde a graduação e sempre esteve de prontidão em todos os momentos, me apoiando na realização antes e durante o curso. Essa conquista também é nossa!!

A Profa. Msc. Daniele de Oliveira Moura Silva, a qual eu tive o privilégio de ter sido aluno durante a graduação e que hoje em dia é uma grande amiga! Obrigado por me inspirar e por sempre ter acreditado em mim. Conseguimos!!

Por fim, o meu muito obrigado a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me ajudaram na elaboração deste trabalho. Ninguém faz pesquisa sozinho!

SANCHES, Matheus Silva. **Caracterização genotípica e fenotípica dos fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos de *Proteus mirabilis* isolados de carcaças de frango com celulite**. 2019. 100 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2019.

RESUMO

Proteus mirabilis é um patógeno oportunista frequentemente associado a uma variedade de infecções em humanos, no qual as do trato urinário são consideradas as mais prevalentes. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as características genotípicas e fenotípicas dos fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos de 34 cepas de *P. mirabilis* isoladas de carcaças de frango com celulite em um abatedouro no norte do estado do Paraná, Brasil, a fim de inferir um possível risco zoonótico. Das 34 cepas, duas foram escolhidas para avaliar a sua capacidade em reproduzir as lesões de celulite experimentalmente em frangos de corte, sendo uma cepa com maior quantidade de fatores de virulência (LBUEL-A33) e outra com menor quantidade (LBUEL-A34). Os genes *mrpA*, *atfA* (fímbrias) *ireA* (sideróforo), *ptA*, *zapA* (proteases) e *hpmA* (hemolisina) foram encontrados em todos os isolados, enquanto os genes *pmfA* e *ucaA* (fímbrias) foram encontrados em 33 (97,6%) e 17 (50%) cepas respectivamente. Todas as cepas expressaram adesão agregativa em células HEp-2 e formaram biofilme. Das 34 cepas, 28 (82,35%) exibiram efeito citotóxico em células Vero. Em relação ao perfil de resistência, 25 (78,13%) cepas foram consideradas multirresistentes. A presença de genes *bla*_{ESBL} e *bla*_{ampC} conferindo resistência aos β-lactâmicos e *qnr* às quinolonas também foram detectados nos isolados após a presunção no teste fenotípico, no qual 7 (21,88%) isolados continham o grupo CTX-M-2, 11 (34,38 %) continham grupo CIT e 19 (59,38%) continham *qnrD*. Tanto a cepa LBUEL-A33 quanto a LBUEL-A34 desenvolveram lesões de celulite em 24 horas pós-inoculação, no qual o grau das lesões foi estatisticamente similar ao grau das lesões causadas pelo controle positivo ($p < 0,05$), uma *Escherichia coli* Patogênica de Aves (APEC 046). Microscopicamente, tanto a cepa LBUEL-A33 quanto a APEC 046 ocasionaram lesões similares, caracterizadas pela presença de infiltrado inflamatório e necrose da derme e das fibras musculares. Conclui-se com o presente trabalho que *P. mirabilis* isolados de carcaças de frango com lesões de celulite representam um risco zoonótico, pois possuem uma diversidade de fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos, bem como a capacidade de desenvolver lesões de celulite em frangos de corte.

Palavras-chave: Risco zoonótico. Multirresistência. ESBL. Celulite aviária. Frangos de corte.

SANCHES, Matheus Silva. **Genotypic and phenotypic characterization of virulence factors and antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* isolated from chicken carcasses with cellulitis**. 2019. 100 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Proteus mirabilis is an opportunistic pathogen often associated with a variety of human infections, in which urinary tract infections are considered to be the most prevalent. In this context, the present study had the objective of evaluating the genotypic and phenotypic characteristics of the virulence and antimicrobial resistance factors of 34 *P. mirabilis* strains isolated from chicken carcasses with cellulitis in a slaughterhouse in the north of the state of Paraná, Brazil, in order to assess a possible zoonotic risk. Of the 34 strains, two were chosen to evaluate their ability to reproduce cellulite lesions experimentally in broiler chickens, being a strain with the highest number of virulence factors (LBUEL-A33) and another with a lower number (LBUEL-A34). The *mrpA*, *atfA* (fimbriae) *ireA* (siderophore), *ptA*, *zapA* (proteases) and *hpmA* (hemolysin) genes were found in all isolates, while the *pmfA* and *ucaA* genes (fimbriae) were found in 33 (97.6% and 17 (50%) strains respectively. All strains expressed aggregative adhesion on HEp-2 cells and formed biofilm. Of the 34 strains, 28 (82.35%) exhibited cytotoxic effect in Vero cells. Regarding the resistance profile, 25 (78.13%) strains were considered multiresistant. The presence of *bla*_{ESBL} and *bla*_{ampC} genes conferring resistance to β -lactams and quinolones was also detected in the isolates after the presumption in the phenotypic test, in which 7 (21.88%) isolates contained the CTX-M-2, 11 (34.38%) contained CIT group and 19 (59.38%) contained *qnrD*. Both strains LBUEL-A33 and LBUEL-A34 developed cellulite lesions within 24 hours after inoculation, in which the degree of lesions was statistically similar to the degree of lesions caused by the positive control ($p < 0.05$), a Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC 046). Microscopically, both the LBUEL-A33 and APEC 046 strains caused similar lesions, characterized by the presence of inflammatory infiltrate and necrosis of the dermis and muscle fibers. It is concluded with the present study that *P. mirabilis* isolated from chicken carcasses with cellulite lesions represent a zoonotic risk, since they have a diversity of virulence and antimicrobial resistance factors, as well as the capacity to develop cellulite lesions in broilers.

Keywords: Zoonotic risk. Multiresistance. ESBL. Avian cellulitis. Broiler chickens.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	<i>PROTEUS MIRABILIS</i>	12
2.2	CELULITE AVIÁRIA	13
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>PROTEUS MIRABILIS</i>	15
2.3.1	Adesinas	16
2.3.1.1	Proteus-like manose resistente (MR/P)	16
2.3.1.2	Adesina Celular Uroepitelial (UCA).....	17
2.3.1.3	Fímbria <i>Proteus mirabilis</i> (PMF)	17
2.3.1.4	Fímbria Temperatura Ambiente (ATF).....	18
2.3.2	Urease	18
2.3.3	Formação de biofilme	19
2.3.4	Adesão agregativa.....	21
2.3.5	Proteases	21
2.3.6	Sideróforos	21
2.3.7	Hemolisinas	22
2.3.8	Proteus toxic agglutinin (Pta).....	23
2.4	SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	24
2.4.1	β -lactamases de espectro estendido (ESBL).....	25
2.4.2	β -lactamases do tipo AmpC.....	28
2.4.3	Genes de resistência às quinolonas (<i>qnr</i>)	29
2.5	<i>E. COLI</i> PATOGÊNICA DE AVES (APEC)	31
2.5.1	Receptores de sideróforos IroN e IutA.....	32
2.5.2	Protease OmpT	32
2.5.3	Resistência sérica Iss	33
2.5.4	Hemolisina HlyF.....	33
3	REFERÊNCIAS	34
4	OBJETIVOS	53
4.1	OBJETIVO GERAL	53
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53

5	ARTIGOS CIENTÍFICOS	54
5.1	ARTIGO I	54
5.2	ARTIGO II	79
6	CONCLUSÃO	100

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira possui extrema importância no mercado de frangos de corte, encontrando-se na segunda melhor posição na produção mundial, permanecendo atrás apenas dos EUA, e liderando a exportação do produto. Em 2017, a indústria avícola foi uma exceção em relação aos outros setores no mercado brasileiro, pois não foi abalada frente à crise econômica, apresentando bons resultados e projeções para o ano de 2018 (ABPA, 2017).

A região sul do Brasil é responsável pela maior parte da produção de frangos de corte, no qual o estado do Paraná é considerado o maior produtor nacional e responsável por mais de 35% das exportações de toda a carne de frango produzida no país (SINDIAVIPAR, 2016). Nesse contexto, é de suma importância que a qualidade microbiológica das carcaças de frango seja garantida, a fim de evitar a transmissão de bactérias que representam um potencial zoonótico ao consumidor (ROUGER; TRESSE; ZAGOREC, 2017).

Dentre os produtos de origem animal, as carnes são importantes fontes de transmissão de bactérias responsáveis por causar infecções em humanos (CHINEN et al., 2009; DUQUÉ et al., 2018; CUNHA-NETO et al., 2018). A espécie *Escherichia coli* é frequentemente associada a essas infecções, por fazer parte da microbiota intestinal das aves e algumas cepas possuem fatores de virulência e de resistência aos antimicrobianos (MANGES; JONHSON, 2012; MELLATA, 2013). Além de *E. coli*, outras bactérias também são isoladas de produtos cárneos, mas não são vistas como significantes, devido à pequena quantidade de estudos realizados, como a espécie *Proteus mirabilis*.

P. mirabilis é uma bactéria Gram-negativa, considerada um patógeno oportunista e relacionada com infecções em humanos, principalmente as do trato urinário (SCHAFFER; PEARSON, 2015). Alguns estudos têm demonstrado que *P. mirabilis* encontrados na carne de frango possuem multirresistência aos antimicrobianos (WONG, WAN, CHEN et al., 2013, SHRESTHA et al., 2017), mas nenhum estudo analisa o perfil de virulência desses isolados com o intuito de inferir um potencial patogênico ao consumidor.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar genotípica e fenotipicamente os fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos de *P. mirabilis* isolados de carcaças de frangos de corte na linha de abate de um frigorífico no município de Londrina - PR a fim de avaliar um possível potencial zoonótico das cepas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *PROTEUS MIRABILIS*

P. mirabilis é uma bactéria em forma de bastonete, móvel, dimórfica e Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae (COKER et al., 2000). Classificado como patógeno oportunista, pois eventualmente pode causar infecções em seres humanos (RÓZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997; ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018).

Este microrganismo é amplamente encontrado no meio ambiente, como em águas poluídas e no solo, desempenhando uma função importante na decomposição da matéria orgânica de origem animal (RÓZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997) e também nos intestinos de animais selvagens e domésticos que funcionam como reservatório da espécie (DRZEWIECKA, 2016).

Embora *P. mirabilis* seja encontrado no ambiente, os relatos de casos particulares e a descrição de surtos nosocomiais apontam que essa bactéria é capaz de ocasionar várias infecções (O'HARA; BRENNER; MILLER, 2000; HAMILTON et al., 2018) principalmente em pessoas que se encontram com o sistema imunológico deprimido (DRZEWIECKA, 2016), sendo as infecções do trato urinário (ITU) as mais frequentes (JANSEN et al., 2003; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

P. mirabilis é frequentemente isolado do trato gastrointestinal (WALKER et al., 1999; NORSWORTHY; PEARSON, 2017). Acredita-se que grande parte das infecções do trato urinário são causadas por bactérias encontradas no trato gastrointestinal. Esse fato é sustentado pela confirmação de que alguns pacientes com Infecções do trato urinário (ITU) ocasionadas por *P. mirabilis* apresentam a mesma cepa em suas fezes (PEERBOOMS et al., 1986). Este microrganismo também pode ocasionar infecções no sistema respiratório, olhos, ouvidos, nariz, pele, garganta, queimaduras, feridas e também está relacionado com a meningoencefalite neonatal, empiema e osteomielite (SCHAFFER; PEARSON, 2015).

P. mirabilis possui vários fatores de virulência que o auxiliam no desenvolvimento da ITU, sendo as fímbrias os principais, que funcionam como apêndices e possibilitam a interação da célula bacteriana com a célula do hospedeiro e a urease, uma enzima que possui a função de hidrolisar a ureia em amônia e dióxido de carbono (ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012).

2.2 CELULITE AVIÁRIA

A celulite aviária é conhecida como um processo inflamatório e foi inicialmente descrita na Grã-Bretanha (RANDALL et al., 1984) sendo uma patologia que acomete frangos de corte e causa grandes prejuízos para as indústrias que comercializam essas aves, pois estas são descartadas devido à condenação das carcaças afetadas. Nos EUA já foram estimados prejuízos em torno de US\$ 30 a 40 milhões por ano (NORTON, 1997). Já no Brasil, a celulite já foi responsável pela condenação de 45,2% das carcaças de frangos de corte condenadas por lesões cutâneas, o que gerou perdas econômicas em torno de 10 milhões no ano (FALLAVENA, 2000).

De acordo com a Instrução Normativa (IN) no. 210 de 10/11/1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1998), os frangos designados ao consumo que possuem caráter inflamatório, como por exemplo celulite, devem ser submetidos a condenação parcial e quando a infecção for sistêmica, a medida a ser tomada é a condenação total da carcaça.

A celulite aviária é uma patologia caracterizada pela inflamação purulenta aguda e difusa do tecido subcutâneo das aves, podendo envolver camadas musculares, causando alterações visíveis nos tecidos (FALLAVENA, 2000) resultando em um exsudato com aparência caseosa no tecido subcutâneo das aves, especialmente na região abdominal (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009), ocorrendo com bastante frequência também nas sobrecoxas e com menor frequência na região da cabeça, pescoço, dorso, asas, peito e região cervical, sendo regularmente unilateral (VIEIRA, et al., 2006).

Em relação ao aspecto macroscópico da pele dos frangos com celulite, esta pode ter cor amarelada ou com tons de marrom e encontrar-se inchada no local onde ocorre a doença, possuindo um tamanho variável de 1 a 10 cm. Já em caráter microscópico é representada por uma inflamação do tecido subcutâneo que geralmente forma massas compostas por restos de células necrosadas e bandas de fibrina que podem ser revestidas por tecido conjuntivo composto de heterófilos, macrófagos e linfócitos (FALLAVENA, 2000).

Um estudo executado por Peighambari et al. (1995), visou induzir experimentalmente lesões de celulite em frangos e chegou à conclusão de que os danos na superfície da pele das aves eram essenciais para o desenvolvimento da doença, sustentando sua afirmação pelos resultados obtidos, no qual todos os frangos

que foram infectados por arranhões desenvolveram sinais de celulite em 24 horas após a infecção, enquanto os frangos que foram submetidos a infecção sem danos na pele não desenvolveram lesões de celulite.

O diagnóstico de celulite antes do abate de frangos de corte é quase impossível, pois para a identificação da lesão é necessário que o tecido subcutâneo da ave esteja exposto (FALLAVENA, 2000). Peighambari et al. (1995), ressaltam que apenas a remoção da parte lesionada não é uma ação totalmente segura, pois a bactéria causadora de celulite aviária pode penetrar na pele e eventualmente alcançar a corrente sanguínea acometendo infecções nos órgãos da ave.

A colibacilose é um termo atribuído à diversas doenças causadas por *E. coli*, e quando acomete a avicultura industrial moderna é responsável por grandes perdas econômicas em todo o mundo, sendo que as doenças relacionadas são: Colisepticemia, Peritonite, Pneumonia, Pleuropneumonia, Aerosaculite, Pericardite, Celulite, Doença Respiratória Crônica Complicada (DRCC), Onfalite, Salpingite, Síndrome da Cabeça Inchada, Panoftalmia e Osteomielite (FERREIRA; KNOBL, 2000).

De acordo com Elfadil et al. (1996a) a celulite está diretamente relacionada com a serosite, como por exemplo, pericardite e peritonite e devido a avaliação dessas patologias ocorrerem em linhas de processamentos distintos, torna-se impossível concluir se as lesões de serosite ocorrem antes, simultânea ou isoladamente da celulite.

Diversos fatores podem estar associados ao aparecimento de lesões de celulite, mas acredita-se que uns dos principais seja a inoculação de fezes na pele por meio das unhas das aves nos momentos de manutenção ou coleta para o abate (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009). Esse fator pode ser intensificado pela alta densidade populacional de frangos, que contribui para o aumento do contato direto entre as aves e conseqüentemente o desenvolvimento de celulite (ELFADIL; VAILLANCOURT; MEEK, 1996b).

Na maioria dos casos de celulite aviária a bactéria recuperada é quase sempre *E. coli* (KUMOR et al. 1998; DERAKHSHANFAR; GHANBARPOUR, 2002). Embora outras bactérias eventualmente possam ser encontradas, tais como *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *Enterobacter agglomerans*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Staphylococcus aureus*, essas não são vistas como um agente causal

significante de celulite aviária (DERAKHSHANFAR; GHANBARPOUR, 2002, VAILLANCOURT; BARNES, 2008).

Geralmente os isolados de *E. coli* de lesões de celulite pertencem a dois sorogrupos principais, O2 e O78, produzem fatores de virulência tais como aerobactina e colicina (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009; VAILLANCOURT; BARNES, 2008) e possuem uma alta capacidade de adesão, aumentando a prevalência de celulite em frangos infectados (LECLERC et al., 2003).

A temperatura e o sexo da ave são fatores que predispõe o desenvolvimento da celulite (ELFADIL, et al., 1996b), tendo em vista que os frangos machos demoram mais tempo para empenar, ficando mais tempo exposto a possíveis lesões, e a temperatura afeta diretamente o empenamento da ave, onde os frangos criados em temperaturas mais altas possuem um empenamento mais tardio, elevando a susceptibilidade de lesões na região do abdômen e conseqüentemente o desenvolvimento de celulite (SCHRADER; SINGER; ATWILL, 2004).

A compactação e a umidade da cama de frango também são fatores que favorecem o aparecimento da celulite, pois quanto mais compacta for, mais favorecerá as lesões na região do peito e abdômen. Além disso, a umidade favorece a multiplicação de *E. coli* que eventualmente pode penetrar e desenvolver celulite nessas lesões (ROCHA et al., 2002).

Devido à necessidade de produção em grande quantidade, do perfil de criação e da maneira em que os frangos de corte são manejados, as lesões que acometem a pele como por exemplo, a celulite, vem tornando-se habitual, sendo uma das principais causas de condenação total e parcial de carcaças de frango no mundo todo (VIEIRA et al. 2006).

Sendo assim, a celulite aviária é uma das causas que mais perturba a indústria avícola, pois acomete a condenação de carcaças em grande escala nos abatedouros e frigoríficos devido à aparência repugnante que confere à carcaça e ao receio das patologias sistêmicas (ONDERKA, et al., 1997; KUMOR et al., 1998).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *PROTEUS MIRABILIS*

P. mirabilis possui diversos fatores de virulência, que são estruturas morfológicas, produtos secretados e mecanismos estratégicos que contribuem para sua colonização e infecção, como por exemplo: adesinas, toxinas, hemolisinas,

cápsula, urease, sideróforos, flagelos, adesão e a capacidade de formar biofilme (NIELUBOWICZ et al., 2010; HAMILTON et al., 2018).

2.3.1 Adesinas

Um dos principais fatores de virulência de suma importância para estabelecer a infecção é a adesão às células do hospedeiro. *P. mirabilis* possui uma excepcional habilidade de adesão, pois seu genoma consta com o suporte de 17 operons que codificam fímbrias (PEARSON et al., 2008a).

As principais fímbrias descritas em *P. mirabilis* são: *Proteus-like* manose resistente (MR/P), Fímbria *Proteus mirabilis* (PMF), Fímbria Temperatura Ambiente (ATF) e Adesina Celular Uroepitelial (UCA), também encontrada na literatura pelo nome de Fímbria Não Aglutinante (NAF) (ROCHA; PELAYO; ELIAS, 2007).

2.3.1.1 Proteus-like manose resistente (MR/P)

Entre as fímbrias expressas por *P. mirabilis*, a MR/P é a mais compreendida devido ao grande número de estudos que a envolve, sendo esta importante na formação do biofilme e na colonização dos rins e bexiga do hospedeiro humano (MIRELES et al., 2015).

Um trabalho realizado por Jansen et al. (2004) teve como objetivo avaliar a função da fímbria MR/P na formação do biofilme empregando a cepa selvagem *P. mirabilis* HI4320 e mutantes dela que superexpressavam a fímbria (MR/P ON) ou que eram incapazes de expressá-la (MR/P OFF). Os resultados obtidos demonstraram que (MR/P ON) formou significativamente mais biofilme do que a selvagem (MR/P OFF), comprovando a importância desta fímbria na colonização do trato urinário ascendente.

Outro trabalho executado por Rocha et al. (2007) confirmou as mesmas observações feita por Jansen et al. (2004) sobre a função da fímbria MR/P na formação do biofilme, no qual induziu uma mutação no gene *mrpA* tendo como resultado a redução na formação do biofilme. Além disso, estes autores demonstraram que a fímbria MR/P também possui função na aderência agregativa em células HEP-2, pois a cepa mutada perdeu a capacidade de expressar o fenótipo de adesão agregativa.

2.3.1.2 Adesina Celular Uroepitelial (UCA)

A fímbria UCA foi primeiramente descrita por Wray et al. (1986) que a identificou em um isolado de *P. mirabilis* uropatogênico. A UCA também foi nomeada de Fímbria Não-aglutinante (NAF), sendo conhecida pela sua capacidade de se agregar na superfície de células uroepiteliais (COOK et al., 1995). O termo NAF foi proposto como uma designação alternativa para a fímbria UCA na intenção de facilitar a distinção das outras fímbrias expressas por *P. mirabilis* (TOLSON et al., 1995).

Em um estudo realizado com o intuito de confirmar se a fímbria UCA desempenhava alguma função na colonização do trato urinário, Pellegrino et al. (2013) retiraram e analisaram rins e bexigas de camundongos submetidos a infecção por uma linhagem selvagem de *P. mirabilis* que expressava UCA e por mutantes que não a expressavam. Os resultados evidenciaram que o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos mutantes recuperados dos rins foi significativamente menor em comparação com a cepa selvagem, enquanto que na bexiga não houve diferença significativa, sugerindo que esta fímbria desempenha função no estabelecimento e progressão da ITU a nível renal.

Scavone et al. (2004) imunizaram camundongos com subunidades estruturais de UCA pela via intranasal e relataram um aumento significativo da presença de IgG e IgA na urina do modelo animal, estes que também apresentaram redução significativa no número de UFC recuperadas dos rins e bexigas após o experimento, sugerindo que os anticorpos contra esta fímbria podem proteger o hospedeiro da ITU.

2.3.1.3 Fímbria *Proteus mirabilis* (PMF)

Bahrani et al. (1993) isolaram e sequenciaram o gene *pmfA*, o qual faz parte do operon PMF, relacionado à fímbria PMF e o classificou como um fragmento de 552 pb que expressava um polipeptídeo de 184 aminoácidos.

Massad et al. (1994), realizaram um estudo para analisar a função da fímbria PMF no desenvolvimento da ITU utilizando um mutante *pmfA* para infectar camundongos da linhagem CBA via transuretral. Os resultados indicaram que a capacidade dos mutantes em colonizar a bexiga dos camundongos diminuiu significativamente em comparação à cepa selvagem, enquanto nos rins a colonização foi semelhante a da cepa selvagem, indicando que a fímbria PMF possui importância na colonização da bexiga, mas não dos rins do hospedeiro.

Em contrapartida, Zunino et al. (2003), obtiveram resultados diferentes utilizando o mesmo objetivo de Massad et al (1994), porém com uma metodologia distinta. Infectando camundogos da linhagem CD-1 pela via transuretral e hematogênica foi possível constatar que a colonização dos rins e bexiga foi significativamente mais elevada quando o modelo animal foi submetido à infecção pela cepa selvagem. Os resultados opostos destes trabalhos podem ser justificados pelo fato de que ambos utilizaram vias de infecção e linhagens de camundongos diferentes.

2.3.1.4 Fímbria Temperatura Ambiente (ATF)

A fímbria temperatura ambiente (ATF) foi purificada e caracterizada por Massad et al. (1994), sua subunidade maior, AtfA, possui 24 kDa e não apresenta semelhança com nenhuma das proteínas ou fímbrias codificadas por *P. mirabilis*. Estes autores também verificaram que essas fímbrias possuem maior expressão em caldo Lúria Bertani em temperatura ótima de 23°C.

Um estudo realizado por Zunino et al. (2000) visou constatar o papel da ATF na colonização do trato urinário utilizando um mutante incapaz de expressar tal fímbria e uma cepa selvagem. Os resultados certificaram que a ATF não apresenta função na colonização do trato urinário, pois não foi observada diferença estatística significativa entre o mutante e a cepa selvagem.

2.3.2 Urease

Um dos principais fatores de virulência expressos por *P. mirabilis* que contribui para a infecção do trato urinário é a enzima Urease que hidrolisa a ureia em amônia (NH₃) e dióxido de carbono (CO₂) (NIELUBOWICZ; MOBLEY, 2010). A produção de amônia eleva expressivamente o pH local que resulta na precipitação de íons formando cristais de cálcio (apatita) e fosfato de magnésio e amônia (estruvita), esses que encontram-se retidos dentro dos polissacarídeos produzidos pelas células bacterianas formando um biofilme cristalino em cateteres (JACOBSEN et al., 2011; STICKLER et al., 2014;).

2.3.3 Formação de biofilme

O biofilme bacteriano é caracterizado por um aglomerado de bactérias circundadas por uma matriz polimérica extracelular autoproduzida que pode aderir-se a uma variedade de superfícies bióticas e abióticas favorecendo a adaptação bacteriana a ambientes hostis (BJARNSHOLT, 2013). Além disso, os biofilmes bacterianos são considerados uma ameaça durante o processo infeccioso, tendo em vista que esses conferem a bactéria a proteção contra o sistema imune do hospedeiro e contra a ação dos agentes antimicrobianos, dificultando o tratamento da infecção (JAMAL et al., 2018).

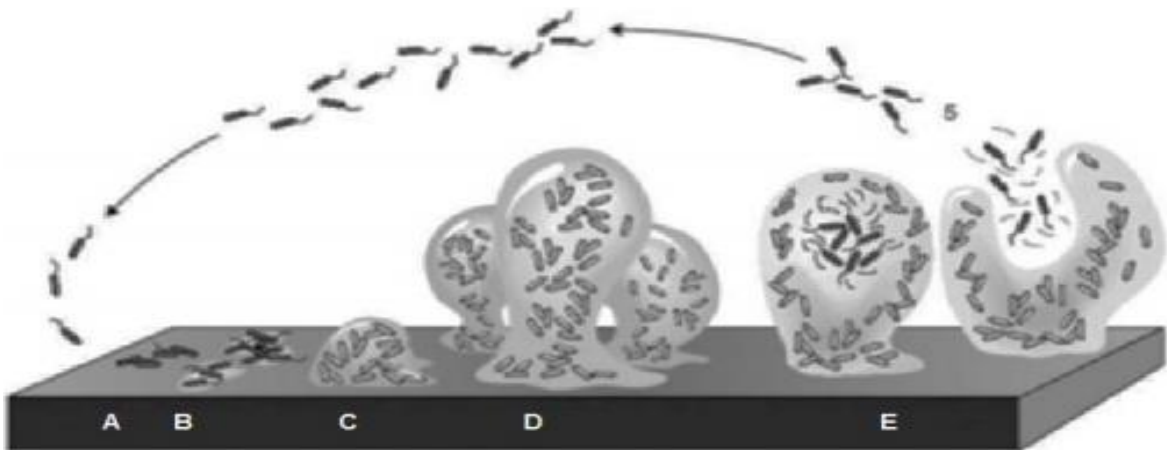
A matriz extracelular é uma estrutura complexa secretada pelas próprias bactérias e composta por uma variedade de substâncias poliméricas (EPS - extracellular polymeric substances), tais como exopolissacarídeos, glicoproteínas, glicolípideos e proteínas. Essas substâncias se relacionam entre si e possibilitam a adesão às superfícies (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007; MARTÍNEZ; VADYVALOO, 2014).

P. mirabilis é bastante conhecido pela sua capacidade em formar biofilme em diversas superfícies abióticas, tais como poliestireno, vidro, látex e silicone e em superfícies bióticas. Essa espécie é frequentemente relatada em biofilmes puros e também polimicrobianos (JACOBSEN; SHIRTLIFF, 2011). Um dos biofilmes mais frequentes produzidos por *P. mirabilis* é associado a cateteres urinários, o qual torna-se mais grave devido a expressão da enzima urease (SHAFFER; PEARSON, 2015). Os biofilmes cristalinos proporcionam proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e aos antimicrobianos (COKER et al., 2000), além de interromper a drenagem da urina através do cateter, caso este não fosse substituído pode propiciar o fluxo contrário da urina infectada para os rins, ocasionando pielonefrite (STICKLER, 2014).

O desenvolvimento do biofilme bacteriano é formado por vários estágios que já foram bem elucidados, tais como a ligação primária reversível a uma superfície, formação de microcolônias (Adesão irreversível), início da maturação do biofilme, diferenciação para biofilme maduro estruturado e posteriormente a sua dispersão (SAUER, 2003). O primeiro estágio é caracterizado pelo processo de adesão bacteriana à superfície (Figura 1A), a qual pode ser facilmente removível por simples processos de lavagem. Em superfícies bióticas, esse estágio é mediado por

interações específicas do tipo receptor-ligante, ao passo que em superfícies abióticas ocorre por interações físico-químicas, tais como interação de carga elétrica. Após o estabelecimento da adesão inicial, essa torna-se irreversível devido às fortes interações físico-químicas ou por meio das estruturas expressas pela bactéria, tais como as fímbrias e polímeros extracelulares (Figura 1B). Em seguida inicia-se a fase da maturação do biofilme, caracterizado pelo início da multiplicação bacteriana e secreção das substâncias poliméricas (Figura 1C). A maturação completa do biofilme é exemplificada pela alta densidade celular e arquitetura do biofilme bem definida, formado por um aglomerado de microcolônias circundadas pela matriz polissacarídica (Figura 1D). Nessa etapa, o biofilme apresenta canais que permitem a recepção de nutrientes e a eliminação de metabólitos potencialmente tóxicos, bem como a interação entre as bactérias. Por fim, ocorre a destruição do biofilme e dispersão de células bacterianas que podem dar início a um novo biofilme em outro lugar (Figura 1E) (SAUER, 2003; BJARNSHOLT, 2013; MARTÍNEZ; VADYVALOO, 2014; JAMAL et al., 2018).

Figura 1 – Esquema dos estágios de desenvolvimento do biofilme bacteriano.



Fonte: SAUER, 2003.

Um estudo conduzido por Jansen et al. (2004), avaliou a participação da fímbria MRP na formação do Biofilme por *P. mirabilis* e observou que a cepa selvagem (MRP/ON) que sempre expressava a fímbria formou significativamente mais biofilme do que a cepa mutante (MRP/OFF). Esses resultados também foram relatados por Rocha et al. (2007), confirmando a importância dessa fímbria na formação de biofilme.

2.3.4 Adesão agregativa

O padrão de adesão agregativo foi identificado por Nataro et al. (1987), o qual estudou diversas cepas de *E. coli* isoladas de fezes de crianças com diarreia e verificaram que algumas dessas expressavam um fenótipo de adesão em forma de “tijolos empilhados” em cultura de células HEp-2 e lamínula. Esse padrão de adesão foi utilizado para classificar um novo patótipo de *E. coli*, diarreiogênica denominado *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).

A capacidade de adesão no padrão agregativo pode auxiliar a bactéria na persistência durante o processo infeccioso e conferir proteção contra o sistema imunológico (JANSEN et al., 2004). Esse fenótipo de adesão já tem sido relatado em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de feridas abdominais (FAVRE-BONTE et al., 1995) e em *P. mirabilis* isolados de ITU. (Rocha et al., 2007). Sabe-se que a fímbria MRP contribui significativamente para a expressão desse fenótipo de adesão em *P. mirabilis* (Rocha et al., 2007).

2.3.5 Proteases

Em *P. mirabilis* a protease que desempenha os processos-chave centrais para estabelecer a infecção no hospedeiro é codificada pelo gene *zapA* e possui a capacidade de degradar IgA e IgG (CARSON, 2011; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

A proteína ZapA contribui para a habilidade do patógeno em colonizar o trato urinário e destruir os componentes estruturais da matriz extracelular do hospedeiro, no qual a sua presença pode ser detectada na urina de pacientes com infecção ocasionada por *P. mirabilis* (ANÉAS et al., 2001; NIELUBOWICZ; MOBLEY, 2010). A princípio, acreditava-se que esta protease era específica em degradar imunoglobulinas, particularmente IgA, mas estudos posteriores comprovaram que essa é capaz de degradar uma ampla diversidade de proteínas do sistema imunológico do hospedeiro (CARSON, 2011; BELAS; MANOS; SUVANASUTHI, 2004).

2.3.6 Sideróforos

Os sideróforos são peptídeos que possuem intensa afinidade por ferro, são expressos por microrganismos e desempenham a atividade de sequestrar e

transportar Fe^{+3} para o meio intracelular da célula bacteriana (ANDREWS et al., 2003). É considerado um fator de virulência de suma importância quando o ferro está escasso no ambiente, (DRECHSEL, et al., 1993; BENITE; MACHADO; MACHADO, 2002), pois é capaz de sequestrá-lo do hospedeiro para ser utilizado no metabolismo bacteriano (RUSSO et al., 2002; VIEIRA et al., 2007).

Segundo Winkelmann (2002), os principais precursores requeridos para a biossíntese de sideróforos são citrato, aminoácidos e dihidroxibenzoato. Uma vez sintetizado e conduzido para o meio externo da célula bacteriana, o sideróforo quela o ferro e liga-se com alta especificidade a um receptor que se encontra na membrana externa que o conduzirá para o periplasma (BRAUN, 1995) no qual será transportado por proteínas até o citoplasma, onde o ferro se dissocia do sideróforo e é reduzido a forma ferrosa (Fe^{+2}) (FARALDO; SANSOM, 2003).

Em *P. mirabilis* a função de sideróforo é desempenhada especialmente por α -cetoácidos provindos da desaminação do triptofano e fenilalanina (ácido indolpirúvico e ácido fenilpirúvico) e de outros α -cetoácidos que apresentam capacidade de quelar ferro (DRECHSEL et al., 1993).

A princípio pensava-se que *P. mirabilis* não possuía um sideróforo clássico, como o produzido em outros membros da família Enterobacteriaceae, porém o sequenciamento da cepa *P. mirabilis* HI4320 evidenciou que esta codifica dois operons que sintetizam sideróforos (NIELUBOWICZ; MOBLEY, 2010), constituindo um mecanismo importante na quelação do íon ferro, o qual é essencial para o metabolismo bacteriano (SIQUEIRA, et al., 2009).

2.3.7 Hemolisinas

As hemolisinas são toxinas que se inserem na membrana plasmática eucariótica e causam danos às células. Estas estão relacionadas à proliferação de bactérias nos rins do hospedeiro e ao desenvolvimento de pielonefrite em infecções do trato urinário (MOBLEY; CHIPPENDALE, 1990). A atividade hemolítica expressa por *P. mirabilis* é desempenhada por dois genes, *hpmA* e *hpmB*, que codificam, respectivamente, as proteínas HpmA (166 kDa) e HpmB (63 kDa) (UPHOFF; WELCH, 1990; COKER et al., 2000; CESTARI et al., 2013).

A proteína HpmA está localizada no periplasma e sua ação é dependente da proteína HpmB, que é encontrada na membrana externa e possui a função de ativar e transportar HpmA para o meio extracelular (TIMOTHY; RODNEY, 1990).

As hemolisinas produzidas por *P. mirabilis* são toxinas que possuem a função de induzir poros na membrana plasmática celular de organismos eucariontes e não são fundamentais para estabelecer a infecção na fase inicial da ITU inferior (COKER, 2000). Sua ação pode ser identificada por meio da lise de hemácias de carneiro, originando um halo de hemólise em torno do crescimento bacteriano em ágar sangue (MORGAN et al., 1985).

De acordo com Cestari et al. (2013) existem evidências de que a atividade hemolítica está relacionada com a capacidade invasiva e citotóxica em células Vero (Rim de macaco verde africano) por *P. mirabilis*, elevando sua virulência perante a infecção. Tal indício foi constatado por Swihart & Welch (1990), no qual fizeram uso de mutantes *hpmA* e evidenciaram que estes perderam tanto a capacidade hemolítica quanto citotóxica em células Vero.

Além disso, Swihart & Welch (1990) também observaram que alguns isolados de *P. mirabilis* podem expressar, além da HpmA, a hemolisina HlyA, que apresenta similaridade com a HlyA produzida por *E. coli* e não é tão frequente em *P. mirabilis* quando comparada com a HpmA.

2.3.8 Proteus toxic agglutinin (Pta)

O gene *ptA* em *P. mirabilis* codifica uma protease alcalina dependente de cálcio, autotransportadora, imunogênica e com função proteolítica (NIELUBOWICZ; SMITH; MOBLEY, 2008).

Um estudo realizado por Alamuri et al. (2009) visou construir mutantes de *P. mirabilis* para os genes das citotoxinas *hpmA* e *ptA* com a finalidade de investigar a atividade de ambas na infecção do trato urinário. A inativação da citotoxina Pta resultou em diminuições significativas nas cargas bacterianas dos mutantes nos rins dos camundongos, enquanto o mutante para os dois genes produziu menor efeito citotóxico, sugerindo que o efeito aditivo de ambas toxinas é crítico na infecção do trato urinário.

2.4 Sensibilidade e resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é reconhecida como um problema de saúde pública crescente em todo o mundo, pois a maioria dos pacientes que desenvolvem infecções adquiridas nos hospitais são causadas por bactérias patogênicas ou oportunistas resistentes aos antimicrobianos (GUIDOS, 2011; FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017).

A resistência bacteriana pode ser classificada como inata ou adquirida. A resistência adquirida pode ser mediada por mutação ou por processos de transferência genética, tais como conjugação, transformação e transdução. Esses métodos de transferência conferem à bactéria uma ampla diversidade de mecanismos bioquímicos de resistência, sendo os mais frequentes a inativação do composto químico por enzimas e a alteração do sítio alvo do antimicrobiano (GIEDRAITIENĖ et al., 2011; ROCA et al., 2015).

O uso de antimicrobianos na produção animal, especialmente na avicultura, contribui diretamente para o aumento da resistência bacteriana. Os frangos de corte possuem grande comercialização em todo o mundo, e devido à grande demanda de vendas, a criação intensiva dessas aves acaba por utilizar altas quantidades de antimicrobianos com o intuito de profilaxia, tratamento e como promotores de crescimento (NHUNG; CHANSIRIPORNCHAI; CARRIQUE-MAS, 2017).

A utilização de antimicrobianos na avicultura é um fator de risco para a saúde humana e muito se questiona sobre a presença de resíduos desses compostos químicos nos tecidos dos animais, além disso, o uso estendido desses compostos na avicultura pode resultar na seleção de bactérias resistentes e patogênicas em humanos (MENDES, et al., 2013; FOUNOU et al., 2018).

O aumento da frequência de novas linhagens resistentes a antimicrobianos na medicina veterinária tem se tornado uma grande preocupação, pois as bactérias resistentes estão mais relacionadas com o alto índice de morbidade e mortalidade quando comparadas com as cepas sensíveis (HELMS, et al., 2002; O'NEILL, 2016).

Os antimicrobianos foram introduzidos na medicina veterinária posteriormente a sua comercialização para fins terapêuticos em humanos. Alguns desses foram atribuídos exclusivamente para o uso veterinário desde o início, mas pertencem às classes de antimicrobianos comumente utilizados na medicina humana e que são

estruturalmente semelhantes, tais como os macrolídeos e fluoroquinolonas (PUYVELDE; DEBORGGRAEVE; JACOBS, 2018).

Wang et al. (2014) realizaram um estudo em hospitais de Taiwan com o intuito de verificar a susceptibilidade e resistência de *P. mirabilis* isolados de várias fontes entre os anos de 2002 a 2012 e constataram ao longo dos anos um aumento da resistência aos antimicrobianos cefotaxima, ceftazidima e ciprofloxacina. O alto índice de resistência a cefotaxima foi associado à produção de β -lactamase e o de ciprofloxacina ao elevado consumo de quinolonas.

Um estudo realizado por Wong, Wan e Chen (2013) avaliou o perfil de suscetibilidade e resistência de 50 cepas de *P. mirabilis* isoladas de carcaças de frango em Hong Kong e constatou que 80% destes eram resistentes a sulfametoxazol, 66% a cloranfenicol e ácido nalidíxico, 60% a ampicilina e estreptomicina, 52% a ciprofloxacina, 46% a canamicina, 38% a gentamicina, 36% a ceftriaxona, 34% a cefotaxima, 22% a ceftiofur e 16% a amoxicilina + ácido clavulânico.

Nesse sentido, a resistência aos antimicrobianos na área veterinária representa sérios riscos à saúde humana, tendo em vista os relatos de bactérias multirresistentes encontradas em alimentos de origem animal, representando um potencial patogênico aos consumidores.

2.4.1 β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

Os antimicrobianos classificados como β -lactâmicos são amplamente empregados no tratamento de infecções causadas por Enterobactérias. Esses incluem as classes das cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Em contrapartida, uma das limitações no tratamento com esses antimicrobianos, é devido ao aumento de cepas produtoras de β -lactamases, enzimas que inativam os antimicrobianos hidrolisando o seu anel estrutural β -lactâmico (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017). Esse fenômeno de resistência bacteriana é responsável por consideráveis falhas terapêuticas, visto que essas cepas geralmente apresentam resistência a outras classes de antimicrobianos, limitando a terapêutica hospitalar (DHILLON; CLARK, 2011; PITOUT, 2012).

As β -lactamases são classificadas de acordo com dois sistemas de nomenclaturas principais, o de Ambler e o Bush-Jacoby. O sistema de classificação de Ambler agrupa as enzimas de acordo com a sua estrutura, similaridade e sequência

dos aminoácidos, essas são divididas em quatro grupos: A, B, C e D. O sistema de classificação de Bush baseia-se na afinidade da hidrólise pelo substrato e na inativação perante a inibidores destas enzimas (BONOMO, 2017).

O sistema de divisão de Ambler classifica as β -lactamases que possuem o aminoácido serina no centro ativo da enzima como pertencentes às classes A, C e D, sendo denominadas de serina- β -lactamases. Na classe B, são agrupadas as enzimas que são dependentes de íons zinco (Zn^{+2}) como cofator para a sua funcionalidade, denominadas de metalo- β -lactamases (RAWAT; NAIR, 2010).

Os genes responsáveis por codificar essas enzimas estão localizados, na maioria das vezes, em plasmídeos, o que possibilita a sua transferência horizontal para outras bactérias, inclusive de espécies distintas (DIERIKX et al., 2013). Nestes plasmídeos podem ser encontradas diversas famílias de genes codificadores de β -lactamases, tais como CTX-M, SHV, TEM e OXA (YE et al., 2013; RAHMAN, et al., 2018).

Os genes codificadores de β -lactamases pertencentes a família CTX-M e mediados por plasmídeos é relatado por todo o mundo, devido a alterações na sequência gênica, como a causada por mutação, que possibilitou o surgimento de mais de 100 variantes distintas de CTX-M. A distribuição destas enzimas variam de acordo com a localidade geográfica, CTX-M-2 é a mais prevalente na América do Sul, Israel e Japão, CTX-M-14 na China e CTX-M-9/14 na Espanha (BONNET, 2004; BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017).

Geser, Stephan e Hächler (2012) avaliaram a presença de enterobactérias produtoras de ESBL nas fezes de animais de produção na Suíça, correlacionando-as com um possível potencial zoonótico a partir da disseminação destas cepas para a cadeia alimentar. Foi possível constatar a presença de cepas produtoras de ESBL em isolados de suínos, bovinos, ovinos e frangos, destacando-se as cepas isoladas de frangos no qual foi encontrada uma alta prevalência de isolados ESBL positivo, com os genes *bla*_{CTX-M-1} (71%), *bla*_{SHV-12} (17%) e *bla*_{TEM-52} (10%).

Uma pesquisa realizada com 116 *E. coli* patogênica de aves (APEC) no Egito evidenciou uma alta porcentagem de isolados portadores de ESBL (58,6%), no qual os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M-1} foram os mais prevalentes (AWAD; ARAFAT; ELHADIDY, 2016). Em outro estudo conduzido na Espanha, de 11 cepas de APEC resistentes às cefalosporinas, seis eram produtoras de *bla*_{CTX-M-14}, duas de *bla*_{SHV-12}, duas de *bla*_{CMY-2} e uma de *bla*_{SHV-2} (SOLÀ-GINÉS et al., 2015).

A alta prevalência de genes *bla*_{CTX-M} em Enterobactérias, particularmente em *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis*, tem sido documentada no mundo todo (ZHAO; HU, 2013). Estudos realizados no Japão avaliaram a disseminação de genes *bla*_{CTX-M} em *P. mirabilis* de vários centros médicos distintos e geograficamente distantes e constataram que mais de 97,3% dos isolados ESBL positivos eram produtores de *bla*_{CTX-M-2}, evidenciando uma alta prevalência desta enzima em isolados clínicos (SHIBATA et al., 2006; KANAYAMA; KOBAYASHI; SHIBUYA, 2015). Em um Hospital de Taiwan, na China, das 44 cepas clínicas de *P. mirabilis* produtoras de CTX-M, duas carregavam a variante CTX-M-24, duas a CTX-M-66, 22 a CTX-M-14 e 18 a CTX-M-13 (WU et al., 2008).

Uma das hipóteses que relacionam a emergência de bactérias portadoras de ESBL isoladas de carcaças de frango no Canadá é o uso do antimicrobiano ceftiofur, uma cefalosporina de 3^o geração injetada em ovos com o intuito de controlar a onfalite causada por *E. coli* em frangos de corte (Dutil et al., 2010).

Em relação a distribuição dessas enzimas em carnes de frango no Brasil, Botelho et al. (2015) avaliaram 136 isolados de *E. coli* no Rio de Janeiro e detectaram a presença dos genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-8} em um, 17 e oito isolados, respectivamente. Koga et al. (2015a) tiveram o mesmo objetivo e constataram uma alta prevalência do grupo CTX-M-2, seguido por CTX-M-8. Outro estudo realizado por Koga et al. (2015b) também detectou uma alta prevalência de CTX-M-2 e CTX-M-8 em isolados de carcassas de frango comercializadas no Norte do Paraná. A alta prevalência de CTX-M-2 e CTX-M-8 também foi constatada por Egervärn et al. (2014) em carne de frango da Suécia importada da América do Sul, principalmente do Brasil, no qual 95% das amostras continham *E. coli* produtoras de ESBL.

No Brasil, as enzimas do grupo CTX-M são as mais prevalentes, destacando-se CTX-M-2, a qual tem sido encontrada tanto em ambiente hospitalar quanto em animais de produção. A detecção dessas enzimas tem sido relatada em cepas de *Salmonella enterica* isoladas de produtos avícolas em vários estados brasileiros, incluindo o Paraná, um dos estados que mais se destaca na produção de carne de frango (SILVA; LINCOPAN, 2012). Um estudo realizado por Warren et al. (2008) no Reino Unido relatou a presença de *E. coli* produtoras de CTX-M-2 em carne de frango importada do Brasil.

Os estudos que avaliam a presença de β -lactamases em *P. mirabilis* de origem alimentar, assim como a carne de frango, são escassos, sendo essencial a realização

de mais pesquisas, a fim de elucidar a sua prevalência. Nesse sentido, Wong; Wan e Chen (2013) realizaram um estudo com 50 cepas de *P. mirabilis* isoladas de carcassas de frango em Hong Kong e constataram uma alta prevalência de *bla*_{TEM-1} (n=21) e *bla*_{OXA-1} (n=18), seguido por *bla*_{CTX-M-9} (n=6), destacando que alguns isolados possuíram mais de um tipo de *bla*_{genes} em conjunto.

2.4.2 β-lactamases do tipo AmpC

As enzimas pertencentes a classe C de Ambler incluem as β-lactamases AmpC, que são geralmente codificadas por *bla*_{genes} localizados no cromossomo bacteriano (BONOMO, 2017). Entretanto, existem algumas β-lactamases do tipo AmpC codificadas por plasmídeos (pAmpC) com alto potencial de disseminação por transferência horizontal bacteriana. Essas enzimas conferem resistência às penicilinas, inibidores de β-lactamases e cefalosporinas, incluindo as de 3ª geração e são sensíveis a cefalosporina de 4ª geração e carbapenêmicos (ROJAS, 2009). Além desses substratos, também possuem atividade frente aos monobactâmicos, porém em nível menor e geralmente apresentam diminuição na suscetibilidade à cefoxitina (SANTIAGO et al., 2016).

Atualmente existem seis grupos distintos de AmpC mediados por plasmídeos, sendo esses ACC, CIT, DHA, EBC, FOX e MOX (JACOBY, 2009; CHUONG et al., 2018). A diversidade de AmpC é proporcionada por mutações que causam alterações nas sequências de aminoácidos e modificam a sua estrutura dando origem a novas variantes. Dentre essas, CMY-2 (grupo CIT) é a mais prevalente em isolados clínicos (JACOBY, 2009) e em animais de produção (PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002; SANTIAGO et al., 2016; LALAK et al., 2016).

A produção de AmpC em enterobactérias vem sendo relatada em todo o mundo, tanto em isolados nosocomiais quanto não nosocomiais. A disseminação dessas enzimas é justificada pela transferência de plasmídeos intra e interespecies (JACOBY, 2009). Um grande número de enterobactérias produtoras de AmpC também é relatado em animais de produção e seus produtos cárneos, em especial a carne de frango (BOTELHO et al. 2015). A disseminação destas cepas portadoras de genes plasmidiais AmpC ocorre tanto por humanos quanto por animais, destacando-se os de produção, que representam um fator de risco considerável, tendo em vista a

exportação da carne e a disseminação de cepas resistentes (VOETS et al., 2013; WU et al., 2013).

De acordo com Botelho et al. (2015), linhagens bacterianas não patogênicas codificadoras de β -lactamases ESBL e AmpC mediadas por plasmídeos representam poucos riscos à saúde humana, em contrapartida, a possibilidade de transferência horizontal desses genes é possível, visto que o presente estudo comprovou a transferência por conjugação dos genes *bla*_{CMY-2} e *bla*_{CTX-M} de linhagens não patogênicas para as patogênicas, representando riscos à saúde humana. Naturalmente, *P. mirabilis* não possui *bla*_{ampC} cromossomal, mas pode apresentar essas enzimas em plasmídeos (JACOBY, 2009; SANTIAGO et al., 2016).

Em relação a distribuição de pAmpC em alimentos de origem aviária, Egervärn et al. (2014) avaliaram a carne de frango importada da Europa e da América do Sul para a Suécia e constataram *E. coli* portando a variante CMY-2 em países europeus (Alemanha, Dinamarca e Finlândia) e Sul Americanos (Argentina e Chile). A presença de *E. coli* portadora de *bla*_{CMY} também é relatada em carne de frango da América do Sul importada para o Reino Unido (DHANJI et al., 2010). No Brasil, Koga et al. (2015b) detectaram apenas o grupo CIT em *E. coli* no Norte do Paraná e Botelho et al. (2015) a variante CMY-2, no Rio de Janeiro. Em Hong Kong, China, 450 (8%) cepas de *P. mirabilis* isoladas de carcaças de frangos também foram descritas por carregarem CMY-2 (WONG; WAN; CHEN, 2013).

2.4.3 Genes de resistência às quinolonas (*qnr*)

Os antimicrobianos pertencentes à classe das quinolonas são classificados como sintéticos e de amplo espectro de ação, comumente utilizados no ambiente clínico frente ao tratamento de ITU e respiratório, incluindo tuberculose, infecções de pele, intra-abdominais e sexualmente transmissíveis (KIM; HOOPER, 2014). Além do uso clínico, alguns antimicrobianos pertencentes a essa classe são considerados extremamente importantes para a medicina veterinária, sendo utilizados no tratamento de aves de produção com septicemias, infecções respiratórias e doenças entéricas (WHO, 2011; OIE, 2015).

No entanto, o uso difundido de quinolonas, desde a sua descoberta, contribuiu diretamente para o aumento e disseminação de cepas resistentes a esses antimicrobianos (KIM; HOOPER, 2014). Nesse contexto, os genes de resistência às

quinolonas devido a determinantes plasmidiais (PMQR, do inglês, *plasmid mediated quinolone resistance*) representam um potencial risco à saúde pública, tendo em vista a sua disseminação mundial, com maior prevalência em enterobactérias (STRAHILEVITZ et al., 2009; RUIZ; PONS; GOMES, 2012a; RUIZ et al., 2012b)

A resistência às quinolonas devido a PMQR em bactérias Gram-negativas é geralmente atribuída aos genes *qnr*, *aac(6')Ib-cr*, *qepA* e *oqxAB* (CATTOIR; NORDMANN, 2009; HERNÁNDEZ; SÁNCHEZ; MARTINÉZ, 2011; RUIZ et al., 2012b). Os genes *qnr* são frequentemente encontrados em plasmídeos de multirresistência, no qual os genes de β -lactamases são os mais comuns (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014). As proteínas codificadas por genes *qnr* reduzem a suscetibilidade às quinolonas, protegendo as enzimas DNA girase e Topoisomerase IV, alvos da droga (JONG et al., 2018).

A descoberta do primeiro gene de PMQR, denominado de *qnrA* foi realizada por Martínez-Martínez; Pascual; Jacoby (1998) quando estudavam o plasmídeo pMG252 de um *K. pneumoniae* multirresistente isolada de infecção do trato urinário, em Birmingham, Inglaterra. Atualmente, existem cinco famílias de genes de resistência do tipo *qnr*, sendo essas dominadas de *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS* (CATTOIR et al., 2007; CAVACO et al., 2009; WANG et al., 2009).

Em relação a detecção de genes *qnr* carregados por isolados clínicos de *P. mirabilis*, *qnrC* e *qnrD* já foram identificados na China (WANG et al., 2009; HU et al., 2012;), *qnrD* na Itália e Espanha (MAZZARIOL et al., 2012; MACHUCA et al., 2017), *qnrB* e *qnrS* no Irã (MAJLESI et al., 2018), *qnrA* na Tunísia e Nigéria (MAHROUKI et al., 2013; ALABI et al., 2017). Já em *P. mirabilis* isolados de carcaças de frango, *qnrA* e *qnrD* foram relatados em Hong Kong, sendo *qnrD* o mais prevalente (WONG; WAN; CHEN, 2013). Mais estudos precisam ser realizados para elucidar a prevalência de genes *qnr* em *P. mirabilis*.

Um trabalho realizado por Zhang et al. (2014) com *Salmonella* spp isoladas de carcaças de frango na China, detectou a presença dos genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* na frequência de 11,3%, 13,9% e 2,4% respectivamente. Hu et al., (2012) também identificaram os genes *qnrB* e *qnrS* em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango em Beijing, China. O gene *qnrB* também já foi descrito em *Salmonella* isoladas de carne de frango na Colômbia (KARCZMARCZYK et al., 2010) e no Brasil (FERRARI et al., 2011). O mesmo gene também foi detectado em *E. coli*, na Itália (CERQUETTI et al., 2009).

2.5 *E. COLI* PATOGÊNICA DE AVES (APEC)

E. coli patogênica de aves (APEC) está diretamente relacionada as doenças extra-intestinais, a qual ocasiona grandes perdas no cenário avícola, tanto por queda na produção, morte e condenação de carcaças em matadouros e frigoríficos. Essas cepas podem possuir vários fatores de virulência, tais como adesinas, toxinas, sistemas de captação de ferro e resistência ao soro do hospedeiro (NAKAZATO et al., 2009).

O aumento e persistência de colibacilose podem ser justificados pela grande quantidade de *E. coli* isolada das fezes das aves e da cama de frango, o que torna impossível o seu controle total no ambiente de criação (MCPEAKE; SMYTH; BALL, 2005; DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). Além disso, os principais genes de virulência relacionados à APEC estão localizados em plasmídeos, o que facilita a transferência genética mediada por conjugação e a emergência de cepas virulentas. (DOBRINDT et al., 2010)

Johnson et al. (2008) realizaram um estudo comparativo entre cepas de *E. coli* isoladas de infecção e fezes aviária e chegaram a conclusão de que os genes *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA* localizados em plasmídeos são encontrados principalmente em isolados de APEC, sugerindo que esses genes são os indicadores na identificação de cepas de APEC.

Os principais genes associados às cepas de APEC desempenham várias funções na patogenicidade, tais como sequestro de ferro do hospedeiro, no qual o gene *iroN* e *iutA* sintetizam receptores dos sideróforos salmoquelina e aerobactina respectivamente, *ompT* que codifica uma protease de membrana externa, *iss* que fornece resistência ao soro do hospedeiro e *hlyF* que codifica uma hemolisina (JOHNSON et al., 2008)

Skyberg et al. (2006) utilizaram uma estirpe receptora de *E. coli* fecal aviária para estudar as contribuições do plasmídeo pAPEC-O2-CoIV e comprovaram estatisticamente que as cepas comensais que receberam o plasmídeo mataram significativamente mais embriões de frango quando comparado a cepa que não possuía o plasmídeo, sugerindo que os genes de virulência encontrados nessa estrutura conjugativa contribuem diretamente para a patogenicidade de APEC.

2.5.1 Receptores de sideróforos IroN e IutA

O ferro é um elemento essencial tanto para o hospedeiro quanto para o patógeno, pois ambos utilizam esse metal como cofator em vias metabólicas básicas, no qual envolvem a replicação celular, transporte de elétrons e síntese de DNA (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004).

Na maioria dos hospedeiros, a concentração do íon férrico disponível é extremamente baixa, tendo em vista que cerca de 99,9% desse íon está associado com proteínas ligantes de ferro, como transferrina, ferritina, lactoferrina e hemoglobina (LI; STOCKER, 2009; WEINBERG, 2009)

Devido a baixa disponibilidade de ferro livre, as bactérias responderam a esta alta pressão seletiva evoluindo seus mecanismos e produzindo moléculas de baixo peso molecular e com alta afinidade por Fe^{+3} , denominadas sideróforos, esses que possuem a especificidade de sequestrar ferro do hospedeiro para manter o metabolismo bacteriano ativo (CROSA; WALSH, 2002).

O gene *iutA* (Iron uptake transport) codifica uma proteína de membrana externa que fornece um sítio de ligação para o sideróforo aerobactina férrica. Já o gene *iroN* está relacionado à síntese de receptores de sideróforo salmoquelina (TOKANO, 2008).

A aerobactina e salmoquelina são moléculas de captação e transporte de ferro comumente utilizadas por *E. coli* extra-intestinais. Estes sideróforos são excretados ao meio externo e se associam ao íon férrico formando um complexo estável, por meio do qual o ferro é transportado para o citoplasma bacteriano (MULLER et al., 2009).

2.5.2 Protease OmpT

O gene *ompT* codifica uma protease localizada na membrana externa capaz de catalisar a quebra de ligações peptídicas em proteínas, liberando peptídeos de tamanhos variáveis ou aminoácidos livres (KIENLE et al., 1992) incluindo aqueles que apresentam efeito antimicrobiano (STUMPE, et al., 1998).

Um estudo realizado por Hejair et al., (2017) analisou a função do gene *ompT* na patogenicidade empregando cepas selvagens e cepas mutantes para o gene em patos e camundongos. Os resultados indicaram que a perda de *ompT* resultou na diminuição significativa de colonização e capacidade de invasão de cérebros, pulmões e sangue. A inativação do gene também reduziu a aderência em culturas de células

BEnd.3, concluindo que o gene *ompT* implica diretamente na patogenicidade de APEC.

2.5.3 Resistência sérica *Iss*

A habilidade de algumas bactérias resistirem aos fatores séricos inibitórios do hospedeiro, especialmente o sistema complemento, tem gerado várias pesquisas e é considerado um dos principais fatores de virulência entre as cepas de APEC, tendo em vista que bactérias sensíveis ao soro não possuem a capacidade de colonizar órgãos internos e causar a colibacilose sistêmica (MELLATA et al., 2003).

Ao que tudo indica, existem diversos componentes bacterianos que contribuem para os casos de resistência sérica, dentre os quais podemos destacar a presença de cápsula e a expressão de proteínas de membrana externas, como a proteína *Iss* “increased serum survival” (LYNNE et al., 2007).

O gene *iss* codifica uma lipoproteína de 10-11 KDa localizada na membrana externa bacteriana e que possui a capacidade de resistir a hidrólise ácida. Esta proteína possui a função de bloquear o complexo terminal do sistema complemento que opera na membrana celular e ocasiona a lise bacteriana (BINNS et al., 1982).

2.5.4 Hemolisina *HlyF*

hlyF é um gene encontrado no plasmídeo pAPEC-O2-ColV, responsável por codificar a hemolisina *HlyF* de *E. coli*, sendo considerado um marcador epidemiológico entre as cepas de APEC (DISSANAYAKE; OCTAVIA; LAN, 2014).

Murase et al. (2015) fizeram uso de um modelo de infecção em frangos para avaliar a contribuição da hemolisina *HlyF* na patogenicidade. Os resultados comprovaram estatisticamente que a cepa mutada para o gene *hlyF* foi significativamente recuperada em menor quantidade do sangue em relação a cepa selvagens, comprovando que a hemolisina *HlyF* contribui para a virulência de APEC durante a infecção.

3 REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>. Acesso em: 01 ago. 2018.

ALABI, O. S. et al. Molecular screening of antibiotic-resistant determinants among multidrug-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* from SouthWest Nigeria. **African health sciences**, v. 17, n. 2, p. 356–365, 2017.

ALAMURI, P. et al. Vaccination with *Proteus* toxic agglutinin, a hemolysin-independent cytotoxin in vivo, protects against *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 632–41, 2009.

ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 215–37, 2003.

ANÉAS, M. A. F. et al. ZapA, a possible virulence factor from *Proteus mirabilis* exhibits broad protease substrate specificity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 11, p. 1397–1403, 2001.

ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 743–754, 2012.

ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T.; PEARSON, M. M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, p. 1–123, 2018.

AWAD, A.; ARAFAT, N.; ELHADIDY, M. Genetic elements associated with antimicrobial resistance among avian pathogenic *Escherichia coli*, **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 59, p. 1–8, 2016.

BAHRANI, F.K. et al. *Proteus mirabilis* fimbrial N-terminal amino acid sequence of a major fimbrial subunit and nucleotide sequences of the gene from two strains. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 884–891, 1993.

BELAS, R.; MANOS, J.; SUVANASUTHI, R. *Proteus mirabilis* ZapA Metalloprotease Degrades a Broad Spectrum of Substrates, Including Antimicrobial Peptides. **Infection And Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5159–5167, 2004.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1155–1164, 2002.

BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P. M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2145–2155, 2017.

BINNS, M. M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R. P. Further characterization of complemente resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes traT of R100 and iss of ColV, I-K94. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 2, p. 654–659, 1982.

BJARNSHOLT, T. The role of bacterial biofilms in chronic infections. **APMIS**, v. 121, p. 1–58, 2013.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1–14, 2004, 2005.

BONOMO, Robert A. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.

BOTELHO, L. A. et al. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 249–54, 2015.

BRASIL, normativa n. 210, de 10 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária da Carne de Aves. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1998.

BRAUN, V. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 295–307, 1995.

CARSON, L. et al. Comprehensive inhibitor profiling of the *Proteus mirabilis* metalloprotease virulence factor ZapA (mirabilysin). **Biochimie**, v. 93, p. 1824–1827, 2011.

CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 8, p. 1–17, 2009.

CERQUETTI, M. et al. First report of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* in an *Escherichia coli* strain of animal origin in Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 3112–3114, 2009.

CHINEN, I. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 167–171, 2009.

CHUONG, V. et al. Multiplex PCR scheme for variant plasmid mediated class C β -lactamase typing. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 32, n. 3, p. 1–6, 2018.

COKER, C. et al. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 12, p. 1497–1505, 2000.

COOK, S. W. et al. Molecular cloning of *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adherence (*uca*) genes. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 2082–2086, 1995.

CROSA, J. H.; WALSH, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 223–2249, 2002.

CUNHA-NETO, A. et al. *Salmonella* isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. **Poultry Science**, v. 97, n. 4, p. 1373–1381, 2018.

DERAKHSHANFAR, A.; GHANBARPOUR, R. A study on avian cellulitis in broiler chickens. **Veterinary archives**, v. 72, n. 5, p. 277–284, 2002.

DHANJI, H. et al. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2534–2537, 2010.

DHILLON, R. H. P.; CLARK, J. ESBLs: a clear and present danger? **Critical Care Research and Practice**, v. 2012, p. 1–11, 2011.

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

DIERIKX, C. et al. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n.1, p. 60–67, 2013.

DISSANAYAKE, D. R.; OCTAVIA, S.; LAN, R. Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 2, p. 403–412, 2014.

DOBRINDT, U. et al. Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. **Med Microbiol Immunol.**, v. 199, n. 3, p. 145–154, 2010.

DRECHSEL, H. et al. Alpha-keto acids are novel siderophores in the genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* and are produced by amino acid deaminases. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 9, p. 2727–33, 1993.

DRZEWIECKA, D. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. **Microbial Ecology**, v. 72, n. 4, p. 741–758, 2016.

DUQUÉ, B. et al. Quantification of *Campylobacter jejuni* contamination on chicken carcasses in France. **Food Research International**, v. 106, p. 1077–1085, 2018.

DUTIL, L. et al. Ceftiofur resistance in *Salmonella enteric* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 48–54, 2010.

EGERVÄRN, M. et al. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 8–14, 2014.

ELFADIL, A. A. et al. Description of cellulites lesions and Associations between cellulites and other categories of condensation. **Avian Disease**, v. 40, p. 690–698, 1996a.

ELFADIL, A. A.; VAILLANCOURT, J. P.; MEEK, A. H. Impact of Stocking Density, Breed, and Feathering on the Prevalence of Abdominal Skin Scratches in Broiler Chickens. **Avian diseases**, v. 40, n. 3, p. 546–552, 1996b.

FALLAVENA, L. C. B. Enfermidades da pele e das penas. In: BERCHIERI JR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas, SP: FACTA, 2000. cap.2, p. 37–47.

FARALDO, J. D. G.; SANSOM M. S. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 105–106, 2003.

FAVRE-BONTE, S.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; FORESTIER, C. Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. **Infect Immun**, 63, p. 1318–1328, 1995.

FERRARI, R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 6, p. 496–498, 2011.

FERREIRA, A. J.; KNOBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 197–205.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623–633, 2010.

FOUNOU, L. L. et al. Antibiotic Resistance in Food Animals in Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 5, p. 648–665, 2018.

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nature Reviews Urology**, v. 12, p. 653–660, 2010.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 36–378, 2017.

GESER, N.; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. **BMC veterinary research**, v.8, n. 21, p. 1–9, 2012.

GIEDRAITIENĖ, A. et al. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina (Kaunas)**, v. 47, n. 3, p. 137–46, 2011.

GUIDOS, R. J. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 5, p. 397–428, 2011.

HAMILTON, A. L. et al. *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 1–19, 2018.

HEJAIR, H. M. A. et al. Role of outer membrane protein T in pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Research in Veterinary Science**, v. 115, p. 109–116, 2017.

HELMS, M. et al. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella Typhimurium*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 490–495, 2002.

HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ, M.B.; MARTINÉZ, J. Quinolone resistance: much more than predicted. **Frontiers Microbiology**, v. 2, p. 1–6, 2011.

HU, Y. et al. Antimicrobial resistance analysis and mechanism of *Salmonella* recovered from retail chicken carcasses in Beijing in summer, 2013. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 46, n. 4, p. 538–545, 2017.

HU, Y. Y. et al. Emergence of *Proteus mirabilis* harboring *bla*_{KPC-2} and *qnrD* in a Chinese Hospital. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2278–2282, 2012.

JACOBSEN, S. M.; SHIRTLIFF, M. E. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 460–465, 2011.

JACOBY, G. A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 5, p. 1–17, 2014.

JACOBY, G.A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, 2009.

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018.

JANSEN, A. M. et al. Mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 12, p. 294–305, 2004.

JANSEN, A. M. et al. Visualization of *Proteus mirabilis* Morphotypes in the Urinary Tract: The Elongated Swarmer Cell Is Rarely Observed in Ascending Urinary Tract Infection. **Infection and immunity**, v. 71, n. 6, p. 3607–3613, 2003.

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**, v. 46, n. 12, p. 3987–3996, 2008.

JONG, A. et al. Characterization of quinolone resistance mechanisms in Enterobacteriaceae isolated from companion animals in Europe (ComPath II study). **Veterinary Microbiology**, v. 216, p. 159–167, 2018.

KANAYAMA, A.; KOBAYASHI, I.; SHIBUYA, K. Distribution and antimicrobial susceptibility profile of extended-spectrum β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* strains recently isolated in Japan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 2, p.113–118, 2015.

KARCZMARCZYK, M. et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* food and animal isolates from Colombia: identification of a qnrB19-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. **FEMS Microbiology Letters**, v. 313, n. 1, p. 10–19, 2010.

KIENLE, Z. et al. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. **Microbiology**, v. 138, p. 1679–1687, 1992.

KIM, E. S.; HOOPER, D. C. Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. **Infection & chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 226–38, 2014.

KOGA, V. L. et al. Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors among *Escherichia coli* Isolated from Conventional and Free-Range Poultry. **BioMed research international**, p. 1–8, 2015b.

KOGA, V. L. et al. Evaluation of the Antibiotic Resistance and Virulence of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chicken Carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 6, p. 1–7, 2015a.

KUMOR, L. W. et al. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. **Avian Diseases**, v. 42 n. 2, p. 285–91, 1998.

LALAK, A. et al. Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. **Veterinary Microbiology**, v. 194, p. 69–73, 2016.

LECLERC, B. et al. Evaluation of the Adhesive Capacity of *Escherichia coli* Isolates Associated with Avian Cellulitis. **Avian Diseases**, v. 47 n. 1, p. 21–31, 2003.

LI, C.; STOCKER, R. Heme oxygenase and iron: from bacteria to humans. **Redox Report**, v. 14, n. 3, p. 95–101, 2009.

LYNNE, A. M. et al. Characterization of a series of transconjugant mutants of an avian pathogenic *Escherichia coli* isolate for resistance to serum complement. **Avian Diseases**, v. 51, n. 3, p. 771–776, 2007.

MACHUCA, J. et al. Prevalence of quinolone resistance mechanisms in Enterobacteriaceae producing acquired AmpC B-lactamases and/or carbapenemases in Spain. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 35, n. 8, p. 487–492, 2017.

MAHROUKI, S. et al. Prevalence of quinolone resistance determinant *qnr* A6 among broad- and extended-spectrum beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* clinical isolates with sul1-type class 1 integron association in a Tunisian Hospital. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 45, p. 600–605, 2013.

MAJLESI, A. et al. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae strains in Hamadan, West of Iran. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 3, p. 426–430, 2018.

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

MARTÍNEZ, L. C.; VADYVALOO, V. Mechanisms of post-transcriptional gene regulation in bacterial biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. 38, p. 15, 2014.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, G. A. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **The Lancet**, v. 14, p. 797–799, 1998.

MASSAD, G.; BAHRANI, F.K.; MOBLEY, H.L.T. *Proteus mirabilis* fimbriae: identification, isolation, and characterization of a new ambient-temperature fimbriae. **Infection and Immunity**, v. 62, p.1989–1994, 1994.

MAZZARIOL, A. et al. Description and plasmid characterization of *qnrD* determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 46–48, 2012.

MCPEAKE, S; SMYTH, J; BALL, H. Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. **Veterinary Microbiology**, v. 110, n. 3, p. 245–253, 2005.

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

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916–932, 2013.

MENDES, F. R. et al. Utilização de antimicrobianos na avicultura. **Revista Nutritime**, v. 10, n. 2, p. 2352–2389, 2013.

MIRELES, A. L. F. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269–284, 2015.

MOBLEY, H. L.; CHIPPENDALE, G. R. Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 3, p. 525–30, 1990.

MORGAN, D. R. et al. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. **Infection and Immunity**, v. 50, n. 1, p. 62–65, 1985.

MULLER, S. I. et al. Salmochelins, the long-overlooked catechol siderophore of *Salmonella*. **Biometals**, v. 22, n. 4, p. 691–695, 2009.

MURASE, K. et al. HlyF Produced by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Is a Virulence Factor That Regulates Outer Membrane Vesicle Biogenesis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 5, p. 856–865, 2015.

NAKAZATO, G. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 7, p. 479–486, 2009.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 6, n. 9, p. 829–831, 1987.

NHUNG, N. T.; CHANSIRIPORNCHAI, N.; CARRIQUE-MAS, J. J. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. **Frontiers in veterinary science**, v. 4, p. 1–17, 2017.

NIELUBOWICZ, G. R.; MOBLEY, H. L. T. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. **Nature Reviews Urology**, v. 7, p. 430–441, 2010.

NIELUBOWICZ, G. R.; SMITH, S. N.; MOBLEY, H. L. T. Outer Membrane Antigens of the Uropathogen *Proteus mirabilis* Recognized by the Humoral Response during Experimental Murine Urinary Tract Infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 4222–4231, 2008.

NORSWORTHY, A. N.; PEARSON, M. M. From Catheter to Kidney Stone: The Uropathogenic Lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 304–315, 2017.

NORTON, R. A. Avian cellulitis. **World's Poultry Science Journal**, v. 53, n. 4, p. 337–349, 1997.

O'HARA, C. M.; BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, Identification, and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, p. 534–546, 2000.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on Antimicrobial Resistance**, p. 1–80, 2016.

OIE. World Organization for Animal Health. List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance. 2015. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf. Acesso em: 02 nov. 2018.

ONDERKA, D. K. et al. *Escherichia coli* associated cellulitis in broilers: Correlation with systematic infection and microscopic visceral lesions, and evaluation for skin trimming. **Avian Disease**, v. 41, p. 935–940, 1997.

PEERBOOMS, P. G. H. et al. Urinary pathogenicity of *Proteus mirabilis* strains isolated from faeces or urine. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 52, n. 1, p. 53–62, 1986.

PEIGHAMBARI, S. M. et al. *Escherichia coli* Cellulitis: Experimental Infections in Broiler Chickens. **Avian Diseases**, v. 39, n. 1, p. 125–134, 1995.

PELLEGRINO, R. et al. *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. **FEMS Pathogens and Disease**. v. 67, n. 2, p. 104–107, 2013.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G. A. Plasmid-Determined AmpCType β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1–11, 2002.

PITOUT, J.D.D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 1–7, 2012.

PUYVELDE, S.; DEBORGGRAEVE, S.; JACOBS, J. Why the antibiotic resistance crisis requires a One Health approach. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 132–134, 2018.

RAHMAN, S. U. et al. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. **Biomed Research International**, v. 2018, p. 1–14, 2018.

RANDALL, C. et al. A new skin disease in broilers? **Veterinary Record**, v. 114, n. 10, p. 246–246, 1984.

RAWAT, D.; NAIR, D. Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 3, p. 263–74, 2010.

REVOLLEDO, L; FERREIRA, A. J. P.; FERREIRA, C. S. A. Doenças de origem bacteriana: Colibacilose. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia aviária**. Barueri, SP: Manole, 2009. p. 67–74.

ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New microbes and new infections**, v. 6, p. 22–29, 2015.

ROCHA, A. C. G. P. et al. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broilers from the south of Brazil. **Avian Disease**, v. 46, n. 3, p. 749–753, 2002.

ROCHA, S. P. D.; PELAYO, J. S.; ELIAS, W. P. Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, p. 1–7, 2007.

ROCHA, S. P. et al. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 319–26, 2007.

ROJAS, D. D. V. M. β -lactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. **Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 29, p. 78–83, 2009.

ROUGER, A.; TRESSE, O.; ZAGOREC, M. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 1–16, 2017.

RÓZALSKI, A.; SIDORCZYK, Z.; KOTELKO, K. Potential Virulence Factors of *Proteus* Bacilli. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 65–89, 1997.

RUIZ, E. et al. *qnr*, *aac(6')*-Ib-cr and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 886–897, 2012b.

RUIZ, J.; PONS, M. J.; GOMES, C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 3, p. 196–203, 2012a.

RUSSO, T. A. et al. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 7156–7160, 2002.

SANTIAGO, G. S. et al. A Review: AmpC β -lactamase production in Enterobacteriaceae. Revisão: Produção de β -lactamases do Tipo AmpC em

Enterobacteriaceae. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, n. 3, p. 17–30, 2016.

SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome Biology**, v. 4, p. 219–223, 2003.

SCAVONE, P. et al. Mucosal vaccination of mice with recombinant *Proteus mirabilis* structural fimbrial proteins. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 853–860, 2004.

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. **microbiology spectrum**, v. 3, p. 66, 2015.

SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. Iron and microbial infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 946–953, 2004.

SCHRADER, J. S.; SINGER, R. S.; ATWILL, E. R. A prospective study of management and litter variables associated with cellulitis in California broiler flocks. **Avian Disease**, v. 48, p. 522–530, 2004.

SHIBATA, N. et al. PCR classification of CTX-M-type betalactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 791–795, 2006.

SHRESTHA, A. et al. Multi-drug resistance and extended spectrum beta lactamase producing Gram negative bacteria from chicken meat in Bharatpur Metropolitan, Nepal. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 1–5, 2017.

SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012.

SINDIAVIPAR – Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná.
Disponível em:

<http://sindiavipar.com.br/index.php?modulo=15&acao=detalhe&cod=159559>. Acesso em: 08 jan. 2018.

SIQUEIRA, A. K. et al. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 206–210, 2009.

SKYBERG, J. A. et al. Acquisition of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Plasmids by a Commensal *E. coli* Isolate Enhances Its Abilities To Kill Chicken Embryos, Grow in Human Urine, and Colonize the Murine Kidney. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6287–6292, 2006.

SOLÀ-GINÉS, M. et al. Diversity of Multi-Drug Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Causing Outbreaks of Colibacillosis in Broilers during 2012 in Spain. **PLoS One**, v.10, n. 11, p.1–14, 2015.

STICKLER, D. J. Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. **Journal of Internal Medicine**, v. 276, n. 2, p. 120–129, 2014.

STRAHILEVITZ, J. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 664–689, 2009.

STUMPE, S. et al. Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 15, p. 4002-4006, 1998.

SWIHART, K.; WELCH, R. Cytotoxic activity of the *Proteus* hemolysin HpmA. **Infection and Immunity**, v. 58 p. 1861–1869, 1990.

TIMOTHY, S. U.; RODNEY, A. W. Nucleotide Sequencing of the *Proteus mirabilis* Calcium-Independent Hemolysin Genes (hpmA and hpmB) Reveals Sequence Similarity with the *Serratia marcescens* Hemolysin Genes (*shIA* and *shIB*). **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 3, p. 1206–1216, 1990.

TOKANO, D. V. et al. Cloning and characterization of the iron uptake gene *iutA* from avian *Escherichia coli*. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 3, p. 473–482, 2008.

TOLSON, D. L. et al. Expression of a nonagglutinating fímbria by *Proteus mirabilis*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 1127–1129, 1995.

UPHOFF, T.; WELCH, R. Nucleotide sequencing of the *Proteus mirabilis* calcium independent hemolysin genes (*hpmA* and *hpmB*) reveals sequence similarity with *Serratia marcescens* hemolysin genes (*shIA* and *shIB*). **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 1206–1216, 1990.

VAILLANCOURT, J.P.; BARNES, H. J. Bacterial diseases: Colibacillosis. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. Iowa, USA: John Wiley & Sons, 2008. p. 691–732.

VIEIRA, J. M. S. et al. Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 2, p. 119–121, 2007.

VIEIRA, T. B. et al. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. **Revista brasileira de Ciências veterinárias**, v. 13, n. 03, p. 174–177, 2006.

VIEIRA, T. B. et al. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. **Revista brasileira de Ciências veterinárias**, v. 13, n. 03, p. 174–177, 2006.

VOETS, G. M. et al. Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 3, p. 359–362, 2013.

WALKER, K. E. et al. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 825–836, 1999.

WANG, J. T. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Proteus mirabilis*: a longitudinal nationwide study from the Taiwan surveillance of antimicrobial resistance (TSAR) program. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 486, 2014.

WANG, M. et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1892–1897, 2009.

WARREN, R.E. et al. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 504–508, 2008.

WEINBERG, E. D. Iron availability and infection. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 7, p. 600–605, 2009.

WHO. World Health Organization. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. 2011. Acesso em 5 nov. 2018. Disponível em: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/136454/e94889.pdf.

WINKELMANN G. Microbial siderophore-mediated transport. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, n. 4, p. 691–696, 2002.

WONG, M. H. Y.; WAN, H. Y.; CHEN, S. Characterization of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Isolated from Chicken Carcasses. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 177–181, 2013.

WRAY, S. K. et al. Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesin from a uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. **Infection and Immunity**, v. 54, p. 43–49, 1986.

WU, G. et al. Comparative Analysis of ESBL-Positive *Escherichia coli* Isolates from Animals and Humans from the UK, The Netherlands and Germany. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–9, 2013.

WU, J. J. et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis* in a Taiwanese university hospital, 1999 to 2005: identification of a novel CTX-M enzyme (CTX-M-66). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 169–175, 2008.

YE, Q. et al. Antibiotic-Resistant Extended Spectrum β -Lactamase- and Plasmid-Mediated AmpC-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Retail Food Products and the Pearl River in Guangzhou, China. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n. 96, p. 1–12, 2017.

ZHANG, Z. et al. Presence of *qnr*, *aac(6')-Ib*, *qepA*, *oqxAB*, and Mutations in Gyrase and Topoisomerase in Nalidixic Acid-Resistant *Salmonella* Isolates Recovered from Retail Chicken Carcasses. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 9, p. 1–8, 2014.

ZHAO, W.; HU, Z. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 79–101, 2013.

ZUNINO, P. et al. *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. **Microbiology**, v. 149, n. 11, p. 3231–3237, 2003.

ZUNINO, P. et al. Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, n. 2, p.137–143, 2000.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar *P. mirabilis* isolados de carcaças de frangos com celulite quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e potencial de virulência por métodos genotípicos e fenotípicos, além de avaliar a capacidade de duas cepas de *P. mirabilis* em desenvolver celulite em frangos de corte.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Detectar genes associados a fatores de virulência em *P. mirabilis*;
- ❖ Caracterizar o padrão de adesão em células HEp-2;
- ❖ Avaliar a capacidade dos isolados perante a formação de biofilme;
- ❖ Analisar a capacidade citotóxica dos isolados em células Vero;
- ❖ Avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de uso clínico humano e veterinário;
- ❖ Detectar genes de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos e Quinolonas;
- ❖ Avaliar a capacidade de duas cepas de *P. mirabilis* em desenvolver celulite em frangos de corte, sendo uma com maior potencial de virulência (LBUEL-A33) e outra com menor potencial (LBUEL-A34).
- ❖ Avaliar se as cepas (LBUEL-A33) + APEC (APEC 046) inoculadas juntas no subcutâneo das aves causam lesões mais graves em comparação a quando foram inoculadas sozinhas.
- ❖ Avaliar as alterações histopatológicas na pele e músculo das aves submetidas a inoculação com *P. mirabilis* e APEC 046.

5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 ARTIGO I

Genotypic and phenotypic profiles of virulence factors and antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* isolated from chicken carcasses: potential zoonotic risk.

Abstract

Proteus mirabilis is an opportunistic pathogen often associated with a variety of human infections acquired both in the community and in hospitals. In this context, the present work aimed to evaluate the genotypic and phenotypic characteristics of the virulence factors and antimicrobial resistance determinants of 32 *P. mirabilis* strains isolated from chicken carcasses in a poultry slaughterhouse in the north of the state of Paraná, Brazil, in order to assess a potential zoonotic risk. The isolates presented a variety of virulence genes that contribute to the development of infection in humans. The *mrpA*, *pmfA*, *atfA* (fimbriae), *ireA* (siderophore), *zapA*, *ptA* (Proteases), and *hpmA* (hemolysin) genes were found in 32 (100%) isolates and *ucaA* (fimbriae) in 16 (50%). All isolates showed aggregative adherence in HEp-2 cells and formed biofilms. Of all strains, 27 (84.38%) showed cytotoxic effects in Vero cells. Antimicrobial susceptibility was tested using 20 antimicrobials, in which 25 (78.13%) strains were considered multidrug-resistant. The presence of *bla*_{ESBL} and *bla*_{ampC} genes conferring resistance to β -lactams and *qnr* to quinolones were also detected in the isolates after presumption in the phenotypic test, in which 7 (21.88%) isolates contained the CTX-M-2 group, 11 (34.38%) contained CIT group and 19 (59.38%) contained *qnrD*. Therefore, chicken carcasses contaminated with *P. mirabilis* may pose a health risk to the consumer, as these isolates have a variety of virulence and antimicrobial resistance characteristics that can be found in *P. mirabilis* strains isolated from human infections.

Keywords: Foodborne, poultry, public health, multidrug-resistant, ESBL, AmpC.

Introduction

The Brazilian poultry industry has been outstanding in both the national and international markets, with Brazil being considered the second largest producer and leader in the world export of chicken meat. The southern region of Brazil is responsible for the majority of the production of broilers, with Paraná state being the largest national producer and accounting for more than 35% of the exports of all chicken meat produced in the country [1].

In view of the commercialization and relevance of the product throughout the world, it is essential to ensure the microbiological quality of poultry meat. In fact, all processing steps during and after the chicken slaughter can contaminate the meat with bacteria present in the avian microbiota and in the slaughterhouse, especially in equipment that helps in the handling of carcasses, cuts, and by-products [2].

The fact that *Proteus* spp. is isolated from chicken feces along with other enteric bacteria, such as *Escherichia coli*, indicates its function as a component of the normal intestinal microbiota [3]. This facilitates the transfer of these bacteria to the slaughter line and cross-contamination, especially in the carcass evisceration process [4].

Some of these bacterial contaminants may remain after carcass processing and survive storage. It is therefore essential for the consumer to be aware that chicken meat can be a source of transmission of micro-organisms. Therefore, taking care of the disinfection of the handling tools after the preparation of the meat in order to avoid possible cross-contamination is essential [4].

The isolation of *P. mirabilis* from food products is documented in some studies, especially in those of animal origin, such as chicken meat, and some of these isolates

are considered multidrug-resistant (MDR) [5, 6]. Bacterial resistance is a global public health threat and the excessive use of antimicrobials in poultry accelerates this phenomenon [7]. The problem is predicted to increase considerably in the coming years due to the intensification of the production of foods from animal origin and the irrational use of antimicrobials [8].

P. mirabilis is a Gram-negative bacterium widely found in the environment and isolated from the gastrointestinal tract of humans and other animals [3]. Although it is considered as a commensal, the reports of occasional cases of infection and the description of nosocomial outbreaks point to its pathogenic potential as an opportunistic bacterium. Urinary tract infection (UTI) stands out as the most prevalent *P. mirabilis* infection, which has the capacity to cause other diseases in humans [9].

The ability of *P. mirabilis* to establish a host infection is conferred by the presence of several virulence factors, such as fimbriae, urease, flagellum, capsule, siderophores, proteases, and hemolysins that support the development of infection [10].

Thus, *P. mirabilis* may have pathogenic potential, cause food poisoning in consumers [11, 12], and may be a public health threat to society due to its strong association with a variety of human infectious diseases [13]. Thus, more research is indicated to discuss and elucidate the zoonotic potential of *P. mirabilis*.

The present work aimed to characterize *P. mirabilis* strains isolated from chicken carcasses in the slaughter line, as well as the genotypic and phenotypic characteristics of virulence factors and antimicrobial resistance. To our knowledge, this is the first study from Brazil that explores the general virulence and antimicrobial resistance characteristics of *P. mirabilis* strains isolated from carcasses of broiler chickens, in order to explore their zoonotic potential.

Materials and methods

Bacterial samples

Overall 32 *P. mirabilis* strains were collected from the thighs and abdomen of carcasses of non-eviscerated broilers in two time periods separated by a 15-day interval. All carcasses were randomly selected in the slaughter line during a sanitary inspection of a poultry slaughterhouse in the north of Paraná, Brazil. The isolates were collected using sterile Swabs and the collected material was transported in Cary-Blair medium (Difco™, USA).

Bacterial Identification

The collected material was transferred to Brain Heart Infusion broth (Difco™, USA) and cultured at 37°C for 24 h. After bacterial growth, the samples were plated on MacConkey Agar plates (Difco™, USA), and incubated at 37°C for 24 h. Suspected colonies were confirmed to be *P. mirabilis* with the biochemical tests EPM, MILi (PROBAC™, BR) and Simmons citrate (Difco™, USA).

Detection of Virulence Genes

The bacterial DNA was obtained with the boiling extraction method. The polymerase chain reaction (PCR) was performed on a GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems™) containing the final volume of 25 µL, composed of 2 mM MgCl₂ (Invitrogen™), 10X buffer (Invitrogen™), 0.2 mM dNTPs (Invitrogen™), 20 pmol Primer Forward, 20 pmol Primer Reverse (Invitrogen™), 1.25U Taq DNA polymerase (Invitrogen®), bacterial DNA and Milli-Q ultrapure water (Millipore™). PCR products were size separated with gel electrophoresis on a 2% agarose gel stained with SYBR SAFE (Invitrogen™) and emerged in TBE buffer (89 mM Tris base, 89 mM Boric Acid, 2 mM EDTA, pH 8.3). The molecular marker used was a 1 Kb Ladder

(Invitrogen™). The amplicons were observed in a transilluminator with ultraviolet light (Vilbert Loumart™). The primers designed in this study were based on a genetic sequence analysis published in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database and were used in the PCR following the conditions: 95°C/5 min, 30 cycles of 95°C/1 min, hybridization temperature/1 min, 72°C/1 min and final extension at 72°C/7 min. The strain *P. mirabilis* HI4320 was used as positive control [14]. Table 1 shows all the genes studied.

Adherence in HEp-2 cells

The adherence capacity of the 32 isolates of *P. mirabilis* to Human Larynx Carcinoma (HEp-2) cells was analyzed as previously described [18]. Bacterial-cell interactions were assayed for 6 hours. HEp-2 cells were grown in 24-well plates with 13 mm coverslips containing 1 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). After formation of a HEp-2 cell monolayer, the medium was discarded and the plates were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS), containing 9.7 mM Na₂HPO₄, 1.25 mM KH₂PO₄, 137.93 mM NaCl, and 2.68 mM KCl. Next, 1 mL DMEM without antibiotics supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) was added to each well. Subsequently, a 40 µL aliquot of the bacterial culture overnight in tryptic soy broth (TSB) was added to each well and the plates were incubated for 3 hours at 37°C. After this step, the wells were washed five times with 1 mL sterile PBS to remove non-adhering bacteria. Once more, 1 mL of DMEM with 2% SFB was added to the wells and incubated for an additional 3 hours at 37°C. At the end of the 6 hours period, the wells were washed 5 times with PBS, then the coverslips were fixed with 100% methanol and stained with May-Grünwald for 5 minutes and Giemsa for 20 minutes. The coverslips were observed under a light microscope at 1000x magnification.

Cytotoxicity in Vero cell cultures

All 32 bacterial isolates were tested in Vero cells (African green monkey kidney) to evaluate cytotoxic capacity as demonstrated [19], with modifications. The isolates were cultured in 3 mL TSB broth at 37°C for 18 h under shaking at 180 rpm. After bacterial growth, the samples were centrifuged at 13000 *g* for 10 minutes. The supernatants were collected and filtered through a syringe filter with a PVDF membrane (Durapore™) with 0.22 µm pore size and 47 mm diameter. Filtered supernatants were added in four repetitions each to a 96-well polystyrene plate at a dilution of 1:10 and subsequently incubated for 72 h at 37°C and 5% CO₂.

The cytotoxicity of the isolates was quantified measuring the metabolic activity of Vero cells with the MTT (3- [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay [20]. Cells without bacterial supernatant were used as a negative control and *E. coli* O157:H7 (EDL933) was used as a positive control for cytotoxicity in Vero cells [21]. The isolate was considered highly cytotoxic when 50% or more of cell death were measured in comparison with the negative control.

Biofilm formation

The biofilm assay was performed on 96-well polystyrene plates as previously described [22] using crystal violet. *E. coli* 042 (O44:H18) [23] was used as positive control for biofilm formation and TSB Broth (Difco™) only was used as negative control. The absorbance readings (A) were performed in a spectrophotometer at a wavelength of 570 nm. The threshold value of the absorbance (T) confirmed the biofilm formation and was defined as the sum of the arithmetic mean of the negative control (nc) and three times the standard deviation (δ), according to the formula (T = xnc + 3δ).

Susceptibility to antimicrobials

The resistance of all 32 isolates was evaluated with the disc diffusion method in Mueller-Hinton agar, using the antimicrobials as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute [24]. The antimicrobials (Oxoid™) used were: Ampicillin (AMP) 10 µg, amoxicillin + clavulanate (AMC) 20/10 µg, cephalotin (CFL) 30 µg, ceftiofur (CFO) 30 µg, ceftazidime (CAZ) 30 µg, Ceftriaxone (CRO) 30 µg, cefotaxime (CTX) 30 µg, cefepime (CPM) 30 µg, nalidixic Acid (NAL) 30 µg, norfloxacin (NOR) 10 µg, ciprofloxacin (CIP) 5 µg, trimethoprim-sulfamethoxazole (SUT) 1.25/23.75 µg, aztreonam (ATM) 30 µg, chloramphenicol (CLO) 30 µg, gentamicin (GEN) 10 µg, amikacin (AMI) 30 µg, ertapenem (ETP) 10 µg and imipenem (IPM) 10 µg. Additionally, ceftiofur (CTF) 30 µg, enrofloxacin (ENO) 5 µg were used [25]. The third-generation cephalosporin-resistant strains were evaluated for the production of extended-spectrum β-lactamases (ESBL) by the double-disc synergism technique following the CLSI recommendations [24]. *E. coli* ATCC® 25922™ was used for quality control purposes.

Detection of resistance genes

The detection of resistance genes was performed by PCR assay. The isolates phenotypically positive for ESBL production were screened for the presence of resistance genes encoding the CTX-M type enzymes 1, 2, 8, 9 and 25 [26], TEM and SHV [27]. The isolates suspected to produce AmpC were also screened for resistance genes from six plasmid mediated AmpC-specific families, MOX, FOX, EBC, ACC, DHA, and CIT [28]. The quinolone resistance genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* [29] and *qnrD* [30] were also investigated in the suspected isolates.

Results

Genotypic and phenotypic profile of virulence

The bacterial isolates studied presented a variety of virulence genes that enable and contribute to the development of infection in humans. The *mrpA*, *pmfA* and *atfA* genes encode fimbriae and were found in 32 (100%) isolates. The *ucaA* gene also encodes a fimbriae and was the less prevalent, being found in only 16 (50%) isolates. Among the protease encoding genes, *zapA* and *ptA* were detected in 32 (100%) isolates. Regarding the genes encoding hemolysins, *hpmA* was detected in 32 (100%) isolates and *hlyA* was not found in any of them. The gene *ireA*, responsible for encoding a siderophores receptor was detected in all isolates, evidencing a high prevalence of these gene in *P. mirabilis* isolated from chicken carcasses.

The phenotypic characterization of the virulence factors investigated in our study showed that all 32 (100%) isolates expressed a pattern of aggregative adhesion to HEp-2 cells cultures and showed a capacity for biofilm formation in polystyrene plates, in which 17 isolates (53.12%) formed a strong biofilm and 15 (46.88%) a very strong biofilm. The profile of biofilm formation of the strains is shown in figure 1. In addition to these phenotypic characteristics of virulence, a highly cytotoxic effect on Vero cell culture was measured for a total number of 27 (84.38%) isolates. The genotypic and phenotypic profile of the virulence factors of these strains is presented in table 2.

Genotypic and phenotypic profile of resistance to antimicrobials

Twenty antimicrobials belonging to several classes were tested. Resistance profiles of isolates ranged of strains susceptible to all antimicrobials tested to strains resistant to 15 different antimicrobials. Of all the antimicrobials tested, the isolates

presented higher frequency of resistance (> 50%) to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefotaxime, nalidixic acid, enrofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole and gentamicin. The isolates showed greater susceptibility to the antimicrobials aztreonam, chloramphenicol, amikacin, ertapenem and imipenem, highlighting the last two in which none of the isolates presented resistance. The frequency of antimicrobial resistance of the isolates is shown in figure 2. Of all the strains, 25 (78.13%) were MDR, being resistant to three or more classes of antimicrobials [47].

The *bla*_{ESBL} genes, responsible for conferring resistance to β -lactam antimicrobials were detected in seven (21.88%) presumptive isolates in the phenotypic test and confirmed in genotypic screening as a CTX-M-2 positive group. Regarding the *bla*_{ampC} genes, 11 (34.38%) isolated showed only the CIT group.

The plasmidial gene *qnrD* that confers resistance to quinolones was found in 19 (59.38%) isolates, demonstrating the high prevalence of this gene in *P. mirabilis* isolated from chicken carcasses. The CTX-M-2 and CIT groups were found together in two isolates, CIT and *qnrD* in seven and *qnrD* and CTX-M-2 in three isolates. The three resistance genes detected in our study were not found together in any of the isolates.

Discussion

The bacterial isolates studied presented a variety of virulence genes that enable and contribute to the development of infection in humans. Among the virulence factors, fimbriae are considered of great importance in the infection process, since they allow the adhesion of the bacterial cell to host cells [9]. Our results evidenced a variety of genes responsible for encoding fimbriae that contribute to infection in humans. The fimbriae Mannose-resistant *Proteus*-like (MR/P), *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) and

uroepithelial cell adhesin (UCA) mediate the colonization of the host urinary tract [31, 32]. A study conducted by Barbour et al. [33] detected the *mrpA* gene in all strains of *P. mirabilis* isolated from chicken and human and identified a high nucleotide similarity between them, suggesting a possible zoonotic potential of these strains. The ambient temperature fimbriae (ATF) do not contribute to UTI, but its expression may allow the permanence of *P. mirabilis* in the environment [16].

A high prevalence of genes encoding proteases, hemolysins and siderophores receptors was also found in our isolates. The ZapA protease has the ability to degrade a wide variety of structural proteins, as well as proteins playing a role in the host immune system [34] and expression of the PtA protease significantly increases the bacterial colonization in the kidneys of mice [35]. The hemolysin HpmA is commonly detected in uropathogenic strains of *P. mirabilis* [17] and play a role in the formation of pores in the eukaryotic plasma membrane causing damage to host cells. These toxins are related to the proliferation of bacteria in the kidneys of the host and the development of pyelonephritis [36]. The hemolysin gene *hlyA* is less frequent in *P. mirabilis* [17, 37] and was not found in any of the bacterial isolates studied by us. The siderophore receptor encoded by the *ireA* gene is considered an important factor of virulence in obtaining Fe⁺³ from the host and maintaining bacterial metabolism during the infectious process [38].

Few studies involving research on virulence factors in *P. mirabilis* strains of food origin are reported. This is the first study that shows evidence for the presence of the virulence genes *pmfA*, *ucaA*, *atfA*, *hpmA*, *zapA*, *ptA* and *ireA* in *P. mirabilis* isolated from chicken carcasses.

The colonization of the epithelium is important for *P. mirabilis* uropathogenicity. This ability can be demonstrated by experiments using different cell lines [39]. The

aggregative adherence pattern has been previously reported in clinical isolates of *P. mirabilis* [15]. It is known that the expression of the MR\|P fimbriae contributes to this adhesion pattern [15]. This evidence supports our results since all the isolates had the *mrpA* gene and expressed the aggregative adherence pattern. This is the first report of *P. mirabilis* isolated from chicken carcasses expressing the aggregative adherence pattern in HEp-2 cells. Until then, this pattern has been demonstrated only in human clinical isolates [15].

The cytotoxic effect is also considered important in the infection process and was exhibited by most of our isolates (84.38%). There is evidence that the hemolysin HpmA is responsible for most of the cytotoxicity in renal cell lines since the isogenic mutant strains for this virulence factor were significantly less cytotoxic than the wild type strains [40]. In addition to hemolysin, the MR/P fimbriae also contributes to cytotoxicity in Vero cells [41].

Foodborne biofilm-forming bacteria pose serious risks to human health and have become increasingly frequent in the food industry, opportunizing the dissemination of biofilm-forming strains, mainly through cross-contamination [42, 43]. Our results are alarming, considering that all the strains isolated from chicken carcasses in a slaughterhouse in the north of Paraná formed strong or very strong biofilm.

In the host, biofilm formation protects bacteria from the immune system and antimicrobials, as well as contribute to the persistence of infection [44]. Biofilms in *P. mirabilis* are well studied, they are mainly associated with urinary catheters, which can block urinary flow and cause ascending infection, pyelonephritis and possible sepsis [45]. It is important to note that some of our isolates, such as the strain LB UEL - A07,

expressed a biofilm at the intensity similar to the positive control EAEC 042, a diarrheagenic *E. coli* very well known to form a very strong biofilm [23] (Figure 1).

The isolation of bacteria that pose a threat to the health of the consumer becomes more aggravating when these, besides having factors of virulence, also present resistance to the antimicrobials, mainly when these are used for the treatment of infections in humans [46]. Our results in figure 2 show, that even though many antimicrobials are prohibited on poultry farms, a high frequency of *P. mirabilis* MDR was found, in which 25 (78.13%) isolates were resistant to three or more classes of antimicrobials [47].

The presence of MDR *P. mirabilis* and producers of ESBLs isolated from chicken meat has been reported in a few studies [6, 48]. The high prevalence of CTX-M-2 and CIT groups has been reported in *E. coli* isolated from chicken carcasses in Paraná, Brazil [49]. In addition, a study in the UK reported the detection of the CTX-M-2 group in *E. coli* isolated from chicken meat imported from Brazil [50].

It is important to highlight the considerable rate of resistance to quinolones and cephalosporins of the third and fourth generation found in this study (Figure 2), since these antimicrobials are frequently used in the treatment of human infections [51, 52]. Similar results were also found in a study in China [6]. Currently, a variety of human infectious diseases are currently treated with quinolones, including abdominal infections, chronic bronchitis, community-acquired pneumonia, nosocomial infections, sexually transmitted infections, skin infections and urinary tract infections [51]. This is the first study reporting the detection of antimicrobials resistance genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CIT} and *qnrD* in *P. mirabilis* isolated from chicken carcasses in Brazil.

Therefore, chicken meat can be a source of transmission and dissemination of *P. mirabilis* strains resistant to antimicrobials and carriers plasmid-mediated resistance

genes to the community. Thus, it is essential that chicken producers are cautious about the prophylactic use of antimicrobial agents in poultry production, mainly as a food additive [53]. The study of resistant bacteria and plasmid-mediated resistance is important mainly because infections caused by resistant strains are more related to high morbidity and mortality rates than susceptible strains [54].

In the present study, it was demonstrated that chicken carcasses of a slaughterhouse in the north of Paraná are a potential risk for consumer health. As shown in table 2, they carried *P. mirabilis* strains with a great diversity of virulence factors and antimicrobial resistance determinants, both phenotypically and genetically. This finding is alarming, since the state of Paraná is responsible for most of the chicken meat exports from Brazil [1].

P. mirabilis has been associated with outbreak of gastroenteritis and vomiting in a study that found the identical *P. mirabilis* strain in a diarrheic stool sample and vomit of a patient affected with food poisoning [55]. The associations of food poisoning caused by *P. mirabilis* were confirmed during an outbreak caused by the consumption of pork cooked in China, in which a identical strain was isolated from the hospitalized individuals, kitchen handler, waiter and contaminated food waste, proving the clonal relation of the strains by Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

The high frequency of *P. mirabilis* recovered from chicken carcasses is alarming since several cases of human infections caused by this pathogen have been reported, including gastrointestinal infections [13], Crohn's disease [56], pneumonia [57], sepsis and infection of the central nervous system [58] and urinary tract infections [10].

Conclusions

In conclusion, *P. mirabilis* isolated from chicken carcasses have a variety of virulence factors and are resistant to multiple antimicrobials used in the treatment of

human infections. Therefore, it is important that the consumer is aware of the risk when handling and preparing chicken meat, as well as performing a correct disinfection of the kitchen tools after the preparation of this meat, in order to avoid contact, cross-contamination, and food poisoning with this pathogen.

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- [1] Abpa (2017) Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual. <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-aneais>. Accessed 01 August 2018.
- [2] Rouger A, Tresse O, Zagorec M (2017) Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms* 5(3):1–16.
- [3] Drzewiecka D (2016) Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microb Ecol* 72(4):741–758.
- [4] Firildak G, Asan A, Goren E (2015) Chicken Carcasses Bacterial Concentration at Poultry Slaughtering Facilities. *Asian J Biol Sci* 8(1):16–29.
- [5] Kim SH, Wei CI, An H (2005) Molecular characterization of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates from retail meat products. *J Food Prot* 68(7):1408–1413.

- [6] Wong MH, Wan HY, Chen S (2013) Characterization of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Isolated from Chicken Carcasses. *Foodborne Pathog Dis* 10(2):177–181.
- [7] Boeckel TPV, Brower C, Gilbert M et al (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *PNAS* 112(18):5649–5654.
- [8] Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-mas JJ (2017) Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Front Vet Sci* 4:1–17.
- [9] Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM (2018) Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus* 8(1):1–123.
- [10] Schaffer JN, Pearson MM (2015) *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectr* 3(5):1–39.
- [11] Wang Y, Zhang S, Yu J et al (2010) An outbreak of *Proteus mirabilis* food poisoning associated with eating stewed pork balls in brown sauce, Beijing. *Food Control* 21(3):302–305.
- [12] Wu Y, Liu X, Chen Q et al (2018) Surveillance for foodborne disease outbreaks in China, 2003 to 2008. *Food Control* 84:382–388.
- [13] Hamilton AL, Kamm MA, Ng SC et al (2018) *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. *Clin Microbiol Rev* 31(3):1–19.
- [14] Pearson MM, Sebahia M, Churcher C et al (2008) Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *J Bacteriol* 190(11):4027–4037.

- [15] Rocha SPD, Elias WP, Cianciarullo AM et al (2007) Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. FEMS Immunol Med Microbiol 51(2):319–326.
- [16] Zunino P, Geymonat L, Allen AG et al (2000) Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. FEMS Immunol Med Microbiol 29(2):137–143.
- [17] Cestari SE, Ludovico MS, Martins FH et al (2013) Molecular Detection of HpmA and HlyA Hemolysin of Uropathogenic *Proteus mirabilis*. Curr Microbiol 67(6):703–707.
- [18] Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM et al (1979) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr Microbiol 3(2):95–99.
- [19] Konowalchuk J, Speirs JL, Stavric S (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun 18(3):775–779.
- [20] Murakami J, Kishi K, Hirai K et al (2000) Macrolides and clindamycin suppress the release of Shiga-like toxins from *Escherichia coli* O157:H7 in vitro. Int J Antimicrob Agents 15(2):103–109.
- [21] Yu J, Kaper JB (1992) Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol 6(3):411–417.
- [22] Kwiecinska-Piróg J, Bogiel T, Skowron K et al (2014) *Proteus mirabilis* biofilm - Qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. Braz J Microbiol 45(4):1423–1431.

- [23] Nataro JP, Yikang D, Cookson S et al (1995) Heterogeneity of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Demonstrated in Volunteers. *J Infect Dis* 171(2):465–468.
- [24] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2018. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th edition. CLSI supplement M100. Wayne, PA.
- [25] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 3rd edition. CLSI Document M31-A3. Wayne, PA.
- [26] Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ (2006) Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 57(1):154–155.
- [27] Arlet G, Philippon A (1991) Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamase (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiol Lett* 66(1):19–25.
- [28] Pérez-pérez FJ, Hanson ND (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 40(6):2153–2162.
- [29] Cattoir V, Poirel L, Rotimi V et al (2007) Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* 60(2):394–397.

- [30] Cavaco LM, Hasman H, Xia S et al (2009) *qnrD*, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrob Agents Chemother* 53(2):603–608.
- [31] Zunino P, Sosa V, Schlapp G et al (2007) Mannose-resistant *Proteus*-like and *P. mirabilis* fimbriae have specific and additive roles in *P. mirabilis* urinary tract infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51(1):125–133.
- [32] Pellegrino R, Scavoane P, Umpiérrez A et al (2013) *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. *Pathog Dis* 67(2):104–107.
- [33] Barbour EK, Hajj ZG, Hamadeh S et al (2012) Comparison of phenotypic and virulence genes characteristics in human and chicken isolates of *Proteus mirabilis*. *Pathog Glob Health* 106(6):352–357.
- [34] Belas R, Manos J, Suvanasuthi R (2004) *Proteus mirabilis* ZapA Metalloprotease Degrades a Broad Spectrum of Substrates, Including Antimicrobial Peptides. *Infect Immun* 72(9):5159–5167.
- [35] Alamuri P, Eaton KA, Himpsl SD et al (2009) Vaccination with *Proteus* Toxic Agglutinin, a Hemolysin-Independent Cytotoxin in Vivo, protects against *Proteus mirabilis* Urinary Tract Infection. *Infect Immun* 77(2):632–641.
- [36] Mobley HLT, Chippendale GR (1990) Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. *J Infect Dis* 161(3):525–530.
- [37] Swihart KG, Welch RA (1990) The Hpma hemolysin is more common than Hlya among *Proteus* isolates. *Infect immun* 58(6):1853–1860.

- [38] Himpf SD, Pearson MM, Arewång CJ et al (2010) Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* 78(1):138–157.
- [39] Rózalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K (1997) Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol Mol Biol Rev* 61(1):65–89.
- [40] Mobley HLT, Chippendale GR, Swihart KG et al (1991) Cytotoxicity of the HpmA hemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular epithelial cells. *Infect Immun* 59(6):2036–2042.
- [41] Scavone P, Villar S, Umpiérrez A et al (2015) Role of *Proteus mirabilis* MR/P fimbriae and flagella in adhesion, cytotoxicity and genotoxicity induction in T24 and Vero cells. *Pathog Dis* 73(4):1–4.
- [42] Zhao X, Zhao F, Wang J et al (2017) Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv* 7(58):36670–36683.
- [43] Galié S, García-gutiérrez C, Miguélez EM et al (2018) Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front microbiol* 9:1–18.
- [44] Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ (2013) Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(4):1–23.
- [45] Armbruster CE, Mobley HLT (2012) Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nat Rev Microbiol* 10(11):743–754.

- [46] Marshall BM, Levy SB (2011) Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin Microbiol Rev* 24(4):718–733.
- [47] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB et al (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18(3):268–281.
- [48] Shrestha A, Bajracharya AM, Subedi H et al (2017) Multi-drug resistance and extended spectrum beta lactamase producing Gram negative bacteria from chicken meat in Bharatpur Metropolitan, Nepal. *BMC Res Notes* 10(1):1–5.
- [49] Koga VL, Scandorieiro S, Vespero EC et al (2015) Comparison of antibiotic resistance and virulence factors among *Escherichia coli* isolated from conventional and free-range poultry. *BioMed Res Int* 2015:1–8.
- [50] Warren RE, Ensor VM, O'Neill P et al (2008) Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 61(3):504–508.
- [51] Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N (2014) Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* 53(10):1565–1574.
- [52] Rahman SU, Ali T, Ali I et al (2018) The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *BioMed Res Int* 2018:1–14.
- [53] Mansouri S, Pahlavanzadeh F (2009) Hemolysin production, salt tolerance, antibacterial resistance, and prevalence of extended spectrum β -lactamases in

Proteus bacilli isolated from clinical and environmental sources. Jundishapur J Microbiol 2(3):97–104.

- [54] Gopinathan A, Mukhopadhyay C, Vandana KE (2017) Characterization of antimicrobial resistance mechanisms of multidrug resistant Gram negative bacterial wound infections and their clinical epidemiology from a tertiary care hospital in Karnataka, India. Int J Res Med Sci 5(3):824–828.
- [55] Shi X, Lin Y, Qiu Y et al (2016) Comparative Screening of Digestion Tract Toxic Genes in *Proteus mirabilis*. PLoS ONE 11(3):1–12.
- [56] Wright EK, Kamm MA, Wagner J et al (2017) Microbial Factors Associated with Postoperative Crohn's Disease Recurrence. J Crohns Colitis 11(2):191–203.
- [57] Okimoto N, Hayashi T, Ishiga M et al (2010) Clinical features of *Proteus mirabilis* pneumonia. J Infect Chemother 16(5):364–366.
- [58] Kassim Z, Aziz AA, Haque QM et al (2003) Isolation of *Proteus mirabilis* from severe neonatal sepsis and central nervous system infection with extensive pneumocephalus. Eur J Pediatr 162(9):644–645.

Table 1. Genes associated with virulence of *P. mirabilis* screened by PCR.

Genes	Primers sequences (5'→3')	Fragments (bp)	Temperatures	References
<i>ireA</i>	(F) ACTACGATAACGAGCGCCAG (R) GCCCTAACTGGGGGAATACG	681	60 °C	[14]
<i>mrpA</i>	(F) GAGCCATTCAATTAGGAATAATCCA (R) AGCTCTGTACTTCCTTGTACAGA	648	58 °C	[15]
<i>ucaA</i>	(F) GCTTTTACATCCCCAGCGGT (R) GCTGCATTTGCTGGCTCATC	476	60 °C	This study
<i>pmfA</i>	(F) CAAATTAATCTAGAACCACTC (R) ATTATAGAGGATCCCTTGAAGGTA	617	54 °C	This study
<i>atfA</i>	(F) CATAATTTCTAGACCTGCCCTAGCA (R) CTGCTTGGATCCGTAATTTTTAACG	382	50 °C	[16]
<i>ptA</i>	(F) CCACTGCGATTATCCGCTCT (R) ATCGGCAGAAGTGACAAGCA	686	60 °C	This study
<i>zapA</i>	(F) TATCGTCTCCTTCGCCTCCA (R) TGGCGCAAATACGACTACCA	332	59 °C	This study
<i>hpmA</i>	(F) GTTGAGGGGCGTTATCAAGAGTC (R) GATACTGTTTTGCCCTTTTGTGC	709	55 °C	[17]
<i>hlyA</i>	(F) AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT (R) ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177	63 °C	[17]

bp: base pairs

Table 2. Genotypic and phenotypic characteristics of virulence and antimicrobial resistance of *P. mirabilis* isolated from chicken carcasses.

Strains	Virulence genes	A.A	C.V.C	Biofilm	Phenotypic profile of resistance	Resistance genes
LB UEL – A01	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, ctf, amc, cfl, cfo, caz, ctx, nal, eno, sut.	CIT, <i>qnrD</i>
LB UEL – A02	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	-	+	Amp, ctf, amc, cfl, cfo, caz, cro, ctx, cpm, nal, eno, sut.	CIT, <i>qnrD</i>
LB UEL – A03	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	-	+	Amp, amc, cfl, cfo, caz, ctx, nal, sut, gen.	CIT
LB UEL – A04	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, ctf, amc, cfl, cfo, caz, cro, ctx, cpm, nal, nor, eno, cip, sut, gen.	CTX-M2, <i>qnrD</i>
LB UEL – A05	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, ctf, amc, cfl, caz, cro, ctx, nal, eno, cip, sut, atm, gen.	<i>qnrD</i>
LB UEL – A06	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, nal, nor, eno, cip, sut, gen.	<i>qnrD</i>
LB UEL – A07	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, amc, cfl, nal, nor, eno, cip, sut, atm, gen.	<i>qnrD</i>
LB UEL – A08	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, ctf, amc, cfl, cfo, caz, cro, ctx.	CIT
LB UEL – A09	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, ctf, amc, cfl, cfo, cro, ctx, cpm, nal, eno, sut, atm, clo.	CTX-M2, CIT
LB UEL – A10	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	-	+	Amp, ctf, amc, cfl, cfo, cro, ctx, cpm, nal, nor, eno, cip, sut.	CTX-M2, <i>qnrD</i>
LB UEL – A11	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, ctf, cfl, cfo, cro, ctx, cpm, nal, nor, eno, cip, sut.	CTX-M2, <i>qnrD</i>
LB UEL – A12	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	cfl, nal, sut.	Not found
LB UEL – A13	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	-	+	Amp, ctf, cfl, cfo, caz, cro, ctx, nal, eno, sut, gen.	CIT, <i>qnrD</i>
LB UEL – A14	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Cfl.	Not found
LB UEL – A15	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, ctf, cfl, cfo, caz, cro, ctx, nal, eno, sut, clo, gen.	CIT, <i>qnrD</i>
LB UEL – A16	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, amc, cfl, cfo, caz, cro, ctx, nal, nor, eno, cip, sut, gen, ami.	CIT, <i>qnrD</i>
LB UEL – A17	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amc, cfl, cfo, caz, ctx, cpm, nal, atm.	Not found

LB UEL – A18	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA,</i>	+	+	+	Amp, ctf, amc, cfl, cro, ctx, cpm, nal, eno, cip, sut, gen.	CTX-M2
LB UEL – A19	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Not found.	Not found
LB UEL – A20	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, nal, nor, eno, cip, sut, gen.	<i>qnrD</i>
LB UEL – A21	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, cfl, nor, eno, cip, sut, clo, gen.	<i>qnrD</i>
LB UEL – A22	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, ctf, amc, cfl, cfo, caz, cro, ctx, cpm, nal, nor, eno, cip, sut, atm.	CTX-M2, CIT
LB UEL – A23	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	-	+	Nal. eno.	<i>qnrD</i>
LB UEL – A24	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, cfl, nor, eno, cip, sut, gen.	<i>qnrD</i>
LB UEL – A25	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, ctf, amc, cfl, cfo, caz, cro, ctx, nal, eno, sut, clo, gen.	CIT, <i>qnrD</i>
LB UEL – A26	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, cfl, cfo, nal, nor, eno, cip, sut, gen.	<i>qnrD</i>
LB UEL – A27	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, amc, cfl, cfo, caz, cro, ctx, nal, eno, sut, gen.	CIT, <i>qnrD</i>
LB UEL – A28	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Ctf, amc, cfl, cfo, nal, sut, gen, ami.	Not found
LB UEL – A29	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Nal, eno, cip.	<i>qnrD</i>
LB UEL – A30	<i>mrpA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, ctf, amc, cfl, cfo, cro, ctx, cpm, nal, gen.	CTX-M2
LB UEL – A31	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Cfl, cfo, nal, eno.	Not found
LB UEL – A32	<i>mrpA, ucaA, pmfA, atfA, ireA, ptA, zapA, hpmA</i>	+	+	+	Amp, amc, cfl, cfo, nal, sut, gen.	Not found

A.A: aggregative adhesion; C.V.C: cytotoxicity in vero cells; +: positive; -: negative; AMP: ampicillin; CTF: ceftiofur; AMC: amoxicillin-clavulanic acid; CFL: cephalotin; CFO: cefoxitin; CAZ: ceftazidime; CRO: ceftriaxone; CTX: cefotaxime; CPM: cefepime; NAL: nalidixic acid; NOR: norfloxacin; ENO: enrofloxacin; CIP: ciprofloxacin; SUT: trimethoprim-sulfamethoxazole; ATM: aztreonam; CLO: chloramphenicol; GEN: gentamicin; AMI: amikacin.

Fig. 1. Intensity of *P. mirabilis* biofilm isolated from chicken carcasses.

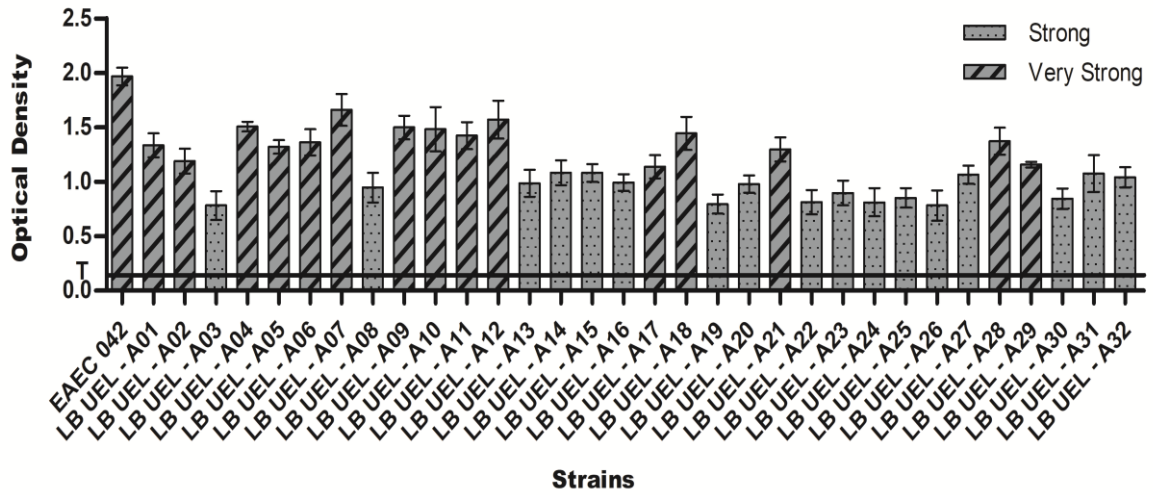
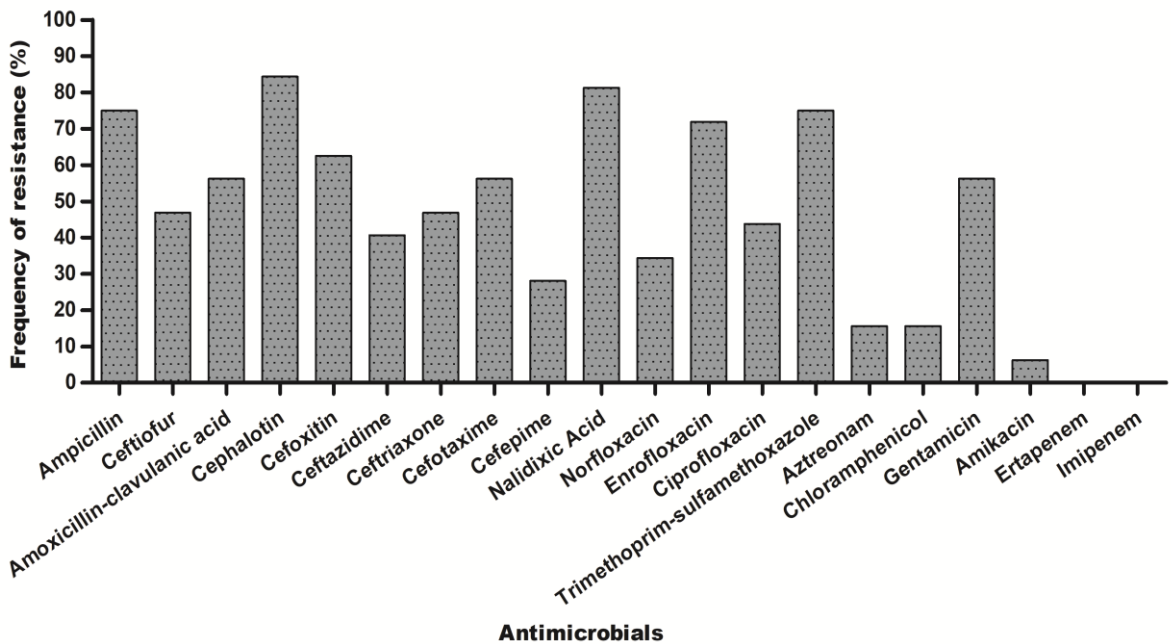


Fig. 2. Frequency of antimicrobial resistance of *P. mirabilis* isolated from chicken carcasses.



5.2 ARTIGO II

Perfil de virulência de *Proteus mirabilis* isolados de lesões de celulite em carcaças de frangos de corte: um novo agente etiológico

Resumo

O presente estudo surgiu com o intuito de isolar *Escherichia coli* de lesões de celulite em carcaças de frangos de corte, sabendo-se que essa é a espécie mais isolada. Em contrapartida, a espécie mais recuperada das lesões foi *Proteus mirabilis*. Sendo assim, o objetivo do nosso estudo foi caracterizar genotípica e fenotipicamente os fatores de virulência de duas cepas de *P. mirabilis* isoladas de carcaças de frango com lesões de celulite e avaliar a capacidade dessas cepas em reproduzir experimentalmente as lesões em frangos de corte. A cepa com maior potencial de virulência (LBUEL-A33) possuiu os genes *mrpA*, *pmfA*, *ucaA*, *atfA* (Fímbrias), *zapA*, *ptA* (Proteases), *hpmA* (Hemolisina) e *ireA* (Sideróforo), formou um biofilme muito forte, expressou o padrão de adesão agregativa e citotoxicidade em células Vero, ao passo que a cepa com menor potencial (LBUEL-A34) não possuiu os genes *pmfA* e *ucaA*, formou um biofilme forte e não expressou citotoxicidade. Ambas as cepas desenvolveram celulite em 24 horas pós-inoculação (PI) e o grau das lesões não foi significativamente alterado até 120 horas (PI), assim como no controle positivo (*E. coli* – APEC 046). A cepa LBUEL-A33 também foi inoculada em associação com APEC 046 e as lesões não se agravaram significativamente. A análise histológica evidenciou que a cepa LBUEL-A33 desenvolveu alterações similarmente a APEC 046, a qual diferenciou-se pela capacidade de ocasionar infecção sistêmica, caracterizada pela presença de bactérias dentro do vaso sanguíneo. Conclui-se que ambas as cepas de *P. mirabilis* isoladas em nosso estudo possuem vários fatores de virulência e a capacidade de desenvolver celulite em frangos de corte.

1 INTRODUÇÃO

A celulite aviária é uma doença caracterizada pela inflamação do tecido subcutâneo, principalmente na região abdominal e coxas, com a presença de exsudatos caseoso e placas fibrinonecróticas (FALLAVENA et al., 2000; BIANCO et al., 2016). O desenvolvimento da celulite em frangos de corte é predisposto por traumas e escoriações na pele da ave que favorecem a entrada de bactérias patogênicas (MACKLIN et al., 1999).

No contexto sanitário da produção avícola, a celulite destaca-se como uma das principais causas de condenação parcial ou total de carcaças, no qual *Escherichia coli* é considerada o principal agente etiológico da doença (NOLAN et al., 2015; POULSEN et al., 2018). Além da *E. coli*, outras espécies também são associadas à celulite, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter agglomerans*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Staphylococcus aureus* (GOMIS et al., 2001), todavia com menor frequência e assumem menor relevância na patogênese da doença.

Proteus mirabilis é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae e amplamente encontrada no meio ambiente e microbiota intestinal de diversas espécies de animais que atuam como reservatório (DRZEWIECKA, 2016). Em contrapartida, *P. mirabilis* é classificado como um patógeno oportunista, pois eventualmente pode causar infecções significantes e persistentes em seres humanos, como feridas, infecções oculares, gastrintestinais e do trato urinário (ARMBRUSTER et al., 2018). Os estudos associando *P. mirabilis* às infecções em animais são escassos, porém já foram relatadas infecções do trato urinário em cães e gatos (MARQUES et al., 2018) e em peixes, causando grande índice de mortalidade (PATTANAYAK et al., 2018).

Diversos fatores de virulência que auxiliam no desenvolvimento de infecções, como fímbrias, urease, proteases, hemolisinas, sideróforos e a capacidade de formar biofilme já foram descritos em *P. mirabilis* em isolados de origem humana (ARMBRUSTER et al., 2018). Dentre esses fatores, as fímbrias são consideradas de suma importância, já que *P. mirabilis* possui uma excepcional habilidade de adesão às células do hospedeiro, pois seu genoma consta com o suporte de vários operons que codificam fímbrias (PEARSON et al., 2008).

O presente estudo surgiu com o intuito de isolar *E. coli* de lesões de celulite em carcaças de frangos de corte, sabendo-se que essa é a espécie mais isolada. Entretanto, a espécie mais recuperada das lesões foi *P. mirabilis*, sendo isolada em cultura pura e em associação com *E. coli*. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar genotípica e fenotipicamente os fatores de virulência de duas cepas de *P. mirabilis* isoladas de lesões de celulite em carcaças de frango e avaliar a capacidade dessas cepas em reproduzir experimentalmente as lesões em frangos de corte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Foram isoladas 34 cepas de *P. mirabilis* de lesões características de celulite localizadas no peito, coxas ou abdome de carcaças de frangos de corte não evisceradas em duas coletas separadas por um intervalo de 15 dias. Todas as carcaças foram selecionadas de maneira aleatória na linha de abate e inspeção sanitária de um frigorífico localizado no Norte do Paraná – Brasil. Os isolados foram coletados com o auxílio de *Swab* estéril e transportados em meio *Cary-Blair* (*Difco*TM, USA). Todas as 34 cepas de *P. mirabilis* recuperadas de celulite foram submetidas a uma caracterização genotípica e fenotípica de seus fatores de virulência (dados não mostrados). Apenas duas cepas foram selecionadas para a realização do ensaio *in vivo*, sendo uma cepa de *P. mirabilis* com maior potencial de virulência (LBUEL-A33) e outra com menor potencial (LBUEL-A34). As cepas de *P. mirabilis* HI4320 (PEARSON et al., 2008) e *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC 046) pertencente a coleção de isolados do Laboratório de Medicina Aviária da Universidade Estadual de Londrina foram utilizadas como controle positivo na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2.2 Identificação bacteriana

O material coletado das lesões de celulite foi transferido para o caldo BHI - Brain Heart Infusion (*Difco*TM, USA) e cultivado a 37°C durante 24 horas. Após o crescimento bacteriano, as amostras foram semeadas em ágar MacConkey (*Difco*TM, USA) e incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias suspeitas foram submetidas a

triagem bioquímica com o auxílio dos testes de EPM, MILi (PROBAC™, BR) e Citrato de Simmons (Difco™, USA).

2.3 Detecção de genes de virulência

Os genes de virulência associados a patogenicidade de *P. mirabilis* foram detectados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os primers descritos na Tabela 1. O DNA bacteriano foi obtido pelo método de extração por fervura seguido de choque térmico. A reação da PCR foi realizada em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, USA), contendo o volume final de 25 µL, composto de MgCl₂ - 2 mM - (Invitrogen®), tampão 10X (Invitrogen®), dNTPs - 0.2 mM (Invitrogen®), Primer Forward - 20 pmol, Primer Reverse - 20 pmol (Invitrogen®), Taq DNA polimerase – 1.25U (Invitrogen®), DNA template e água ultrapura. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% corado com SYBR SAFE (Invitrogen®) e emergido em tampão TBE (89 mM Tris base; 89 mM Ácido Bórico; 2 mM EDTA; pH 8,3). Foi utilizado o marcador molecular 1 Kb Ladder (Invitrogen®). Os amplicons foram observados em transluminador com luz ultravioleta (Vilbert Loumart, France). Além dos genes de virulência de *P. mirabilis*, os genes plasmidiais *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, e *ompT* associados a patogenicidade de APEC também foram pesquisados, seguindo Johnson et al. (2008).

Tabela 1 – Genes associados à virulência de *P. mirabilis* rastreados na PCR.

Genes	Primers sequences (5'→3')	Fragments (bp)	References	
			Temperatures	
<i>IreA</i>	(F) ACTACGATAACGAGCGCCAG (R) GCCCTAACTGGGGGAATACG	681	60°C	Pearson et al. (2008)
<i>MrpA</i>	(F) GAGCCATTCAATTAGGAATAATCCA (R) AGCTCTGTA CTTCCTTGACAGA	648	58 °C	Rocha et al. (2007)
<i>UcaA</i>	(F) GCTTTTACATCCCCAGCGGT (R) GCTGCATTTGCTGGCTCATC	476	60 °C	Este estudo
<i>PmfA</i>	(F) CAAATTAATCTAGAACCACTC (R) ATTATAGAGGATCCCTTGAAGGTA	617	54 °C	Este estudo
<i>AtfA</i>	(F) CATAATTTCTAGACCTGCCCTAGCA (R) CTGCTTGGATCCGTAATTTTAAACG	686	60 °C	Zunino et al. (2000)
<i>PtA</i>	(F) CCACTGCGATTATCCGCTCT (R) ATCGGCAGAAGTGACAAGCA	686	60 °C	Este estudo
<i>ZapA</i>	(F) TATCGTCTCCTTCGCCTCCA (R) TGGCGCAAATACGACTACCA	332	59 °C	Este estudo
<i>hpmA</i>	(F) GTTGAGGGGCGTTATCAAGAGTC (R) GATACTGTTTTGCCCTTTTGTGC	709	55 °C	Cestari et al. (2013)
<i>HlyA</i>	(F) AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT (R) ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA	1177	63 °C	Cestari et al. (2013)

pb: pares de base

2.4 Aderência em células HEp-2

A capacidade de aderência dos isolados às células de Carcinoma de Laringe Humana (HEp-2) foi avaliada como previamente descrito por Cravioto et al., (1979) durante um período de 6 horas. As células HEp-2 foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas circulares de 13 mm contendo 1 mL de DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco) (Gibco®) com Estreptomicina, Penicilina e Anfotericina B 100 µg/mL (Sigma, St. Louis, MO). Após a formação da monocamada de células HEp-2 o meio foi descartado e os poços foram lavados três vezes com Solução Salina Tamponada com Fosfato - PBS (Na₂HPO₄ 9,7 mM; KH₂PO₄ 1,25 mM; NaCl 137,93 mM; KCl 2,68 mM). Posteriormente, 1 mL de meio DMEM suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma, St. Louis, MO) foi adicionada a cada poço junto a uma alíquota de 40 µL da cultura bacteriana cultivada por 18 horas em caldo trípico de soja (TSB) (*Difco™, USA*) e as placas foram incubadas por 3 horas a 37°C. Posteriormente, os poços foram lavados cinco vezes com 1 mL de PBS estéril para

remover as bactérias não aderentes. Novamente, 1 mL de DMEM com 2% de SFB foi adicionada aos poços e as placas foram incubadas por 3 horas a 37°C. Finalmente, os poços foram lavados cinco vezes com PBS e as lamínulas foram fixadas com metanol 100% e coradas com May-Grünwald e Giemsa (Sigma, St. Louis, MO) por 5 e 20 minutos respectivamente.

2.5 Formação de biofilme

O ensaio de biofilme foi realizado em placas de poliestileno contendo 96 poços de acordo com Kwiecinska-Piróg et al. (2014) utilizando cristal violeta. *E. coli* 042 (NATARO et al., 1995) foi usada como controle positivo para a formação do biofilme e apenas o caldo TSB (Difco™) como controle negativo. As leituras de absorbância (A) foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. O valor limiar da absorbância (T) confirmou a formação do biofilme e foi definido como a soma da média aritmética do controle negativo (nc) e um valor triplo de seu desvio padrão (δ), conforme a fórmula ($T = x_{nc} + 3\delta$).

2.6 Citotoxicidade em culturas de células Vero

O perfil de citotoxicidade dos isolados em células Vero foi avaliado como previamente descrito por Konowalchuk et al. (1977), com modificações. Os isolados foram cultivados em 3 mL de caldo TSB (Difco™) por 18 horas sob agitação a 180 rpm. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 13000 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de seringa com membrana de Fluoreto de polivinilideno – PVDF (Durapore®) com 0,22 μ m e na sequencia foram adicionados aos poços da placa de poliestireno na diluição de 1:10, e incubado a 37°C e 5% CO₂ por 72 horas. A citotoxicidade dos isolados foi quantificada após a avaliação da atividade metabólica das células Vero pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), de acordo com Murakami et al. (2000). Células Vero sem o sobrenadante foram utilizadas como controle negativo e como controle positivo a cepa *E. coli* O157:H7 (EDL933) (YU; KAPER, 1992). O isolado foi considerado citotóxico quando atingiu um percentual de 50% ou mais de morte celular quando comparado ao controle negativo.

2.7 Indução experimental de celulite in vivo

O experimento *in vivo* foi realizado no infectório do Laboratório de Medicina Aviária da Universidade Estadual de Londrina – UEL. Todos os procedimentos realizados em nosso estudo foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina protocolo N° 25523.2017.93.

Foram alojados um total de 45 frangos de corte de um dia de idade, machos e pertencentes a linhagem Ross. Os animais receberam água e ração não medicada *ad libitum*, bem como o aquecimento conforme a idade. Os animais foram distribuídos em grupos conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Descrição dos tratamentos avaliados na indução experimental de celulite *in vivo*.

Tratamentos	Descrições	N° de aves
T1	Grupo controle negativo – aves inoculadas com PBS	9
T2	Grupo controle positivo – aves inoculadas com a cepa APEC 046	9
T3	Grupo de aves inoculadas com a cepa <i>P. mirabilis</i> LBUEL-A33	9
T4	Grupo de aves inoculadas com a cepa <i>P. mirabilis</i> LBUEL-A34	9
T5	Grupo de aves inoculadas com a cepa APEC 046 em associação com a cepa <i>P. mirabilis</i> LBUEL-A33	9

2.7.1 Inóculo

O preparo do inóculo foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Norton et al. (1997) com modificações. Assim, as cepas utilizadas no desafio experimental *in vivo* foram cultivadas em caldo BHI (Difco™) por 18-24 horas a 37°C. Após esse período, a cultura foi semeada em Tryptic Soy ágar (Difco™, USA) suplementado com 5% de sangue de carneiro. Algumas colônias foram transferidas para o caldo BHI (Difco™) e incubadas novamente por 18-24 horas a 37°C. A cultura foi submetida a diluição (1:10) para obter o inóculo de (10⁸ UFC/mL), o qual foi confirmado com plaqueamento em ágar MacConkey (Difco™, USA). Todas as aves foram inoculadas dentro de uma hora após a realização das diluições.

2.7.2 Desafio e escore das lesões

O desafio foi realizado aos 15 dias de vida (dv) das aves e consistiu em inocular 1 mL da cultura bacteriana (10^8 UFC/mL) ou PBS diretamente no tecido subcutâneo da região peitoral com o auxílio de uma agulha estéril (0,45x13mm). Previamente ao desafio foi realizada a assepsia local com Clorexidina 2%.

Nos momentos 24, 72 e 120 horas após a inoculação, três aves de cada grupo foram eutanasiadas por deslocamento cervical e submetidas ao exame de necropsia. O material de todas as aves foi coletado com o auxílio de Swab estéril, o qual foi friccionado sobre a região subcutânea, após a assepsia e incisão da pele. Os Swabs foram inoculados em caldo BHI (Difco™) e incubado a 37°C por 24 horas. Após esse período, a cultura foi semeada em ágar MacConkey (Difco™, USA) e uma colônia bacteriana de cada lesão/ave foi selecionada para a identificação bioquímica e triagem para os genes de virulência, a fim de confirmar a cepa inoculada. O escore macroscópico da lesão foi classificado em ausência de lesão, discreta, moderada e grave de acordo com Peighambari et al. (1995).

2.7.3 Análise histológica

Com o intuito de avaliar as características das lesões microscópicas, fragmentos de 1 cm² de pele e músculo do peito das aves pertencentes aos tratamentos T1, T2, T3 e T5 foram coletados, fixados em formalina tamponada 10% por 24 horas e posteriormente conservados em álcool 70° GL até o processamento. Os fragmentos de tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de álcoois, embebidos em parafina e realizados cortes histológicos (5µm) corados pela técnica de hematoxilina/eosina (HE). As lâminas foram observadas ao microscópio óptico.

2.7.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Formado por cinco grupos, contendo nove animais cada um. Os resultados do escore macroscópico das lesões (cm²) foram submetidos à análise de variância, seguido pelo teste de Scott-knott, utilizando o software estatístico R versão 3.5.1. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0.05$.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização genotípica e fenotípica dos fatores de virulência.

Em relação as características genotípicas de virulência, ambas as cepas LBUEL-A33 e LBUEL-A34 possuíram genes relacionados a patogenicidade de *P. mirabilis* em humanos. A cepa LBUEL-A33 apresentou todos os genes pesquisados e associados à patogenicidade de *P. mirabilis*, com exceção do *hlyA*, responsável por codificar a hemolisina HlyA (Tabela 3). A cepa LBUEL-A34 apresentou um perfil genotípico de virulência similar a LBUEL-A33, diferenciando-se pela ausência dos genes *pmfA* e *ucaA*, envolvidos na codificação de fímbrias (Tabela 3). Os genes plasmidiais *iutA*, *hlyF*, *iss*, *iroN*, e *ompT* comumente associados a virulência de APEC não foram encontrados em nenhuma das duas cepas.

A caracterização fenotípica dos fatores de virulência evidenciou que a cepa LBUEL-A33 expressava o padrão de adesão agregativa em células HEp-2, formava um biofilme com intensidade muito forte e era altamente citotóxica em células Vero. A cepa LBUEL-A34 também apresentou adesão agregativa, porém formou um biofilme com intensidade forte e não foi considerada altamente citotóxica. O perfil genotípico e fenotípico de ambas as cepas é representado na Tabela 3.

Tabela 3 – Características fenotípicas e genotípicas dos fatores de virulência das cepas utilizadas no experimento *in vivo*.

Cepas	Ensaio genotípicos		Ensaio fenotípicos		
	Genes de virulência de <i>P. mirabilis</i>	Genes de virulência de APEC	HEp-2*	Biofilme	Vero**
LBUEL-A33	<i>mrpA</i> , <i>pmfA</i> , <i>ucaA</i> , <i>atfA</i> , <i>zapA</i> , <i>ptA</i> , <i>hpmA</i> , <i>ireA</i>	Não detectado	Adesão agregativa	Muito forte	Sim
LBUEL-A34	<i>mrpA</i> , <i>atfA</i> , <i>zapA</i> , <i>ptA</i> , <i>hpmA</i> , <i>ireA</i>	Não detectado	Adesão agregativa	Forte	Não

* Perfil de adesão em células HEp-2; ** Citotoxicidade em células Vero.

3.2 Indução experimental de celulite *in vivo*

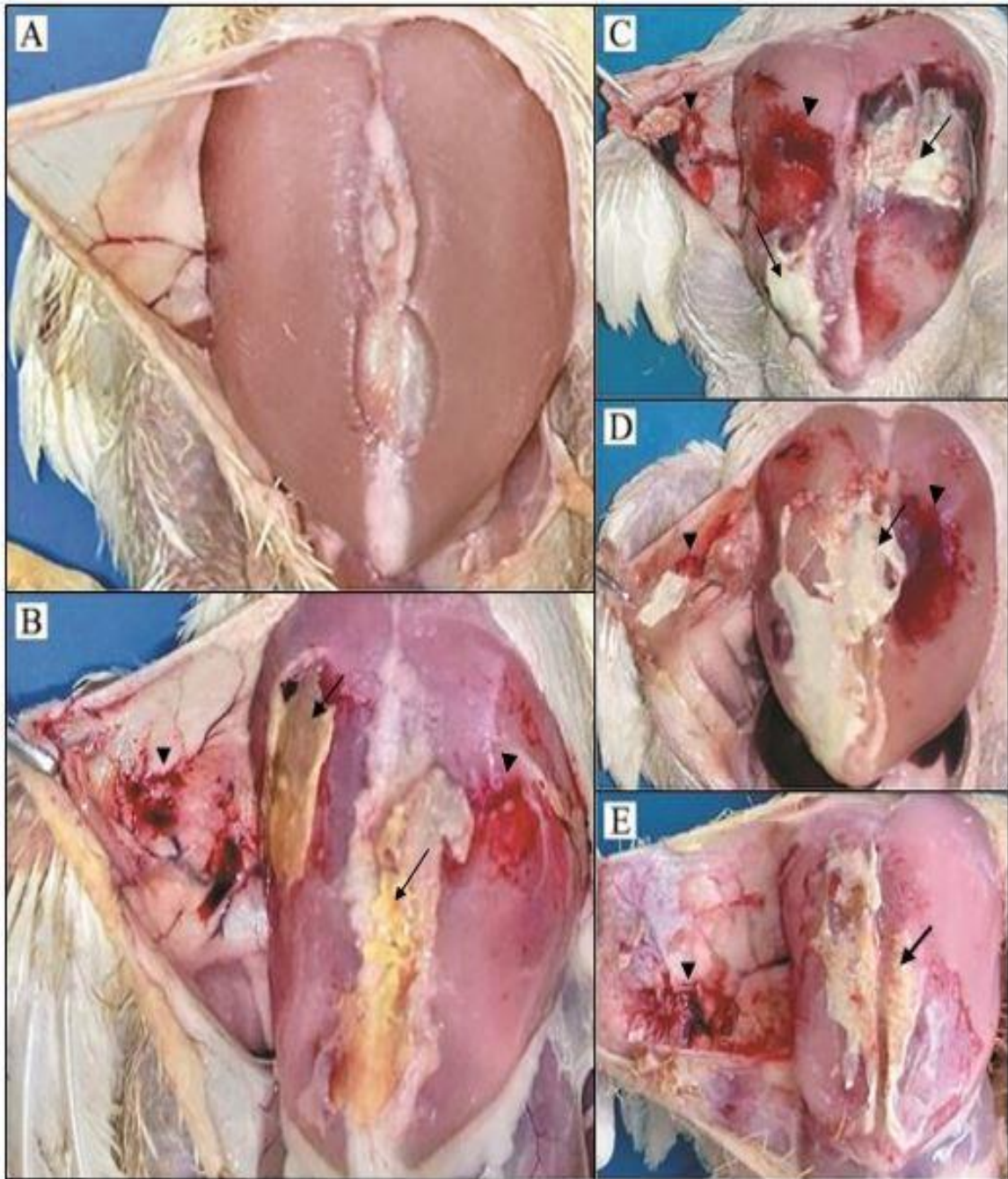
Todas as aves que foram inoculadas com a cepa de APEC 046 (T2), *Proteus mirabilis* LBUEL-A33 (T3), LBUEL-A34 (T4) e LBUEL-A33 associada a APEC 046 (T5) apresentaram lesões características de celulite em 24 horas após a inoculação.

Enquanto que as aves do controle negativo, inoculadas com PBS (T1) não desenvolveram lesões. Foi observado, que 6/9 (66,67%) aves pertencentes ao grupo T2, apresentaram lesões classificadas como graves e 3/9 (33,33%) como moderadas. Já em T3, 4/9 (44,44%) apresentaram lesões graves e 5/9 (55,56%) moderadas. No T4, 3/9 (33,33%) aves apresentaram lesões graves, 5/9 (55,56%) moderadas e 1/9 (11,11%) discreta, ao passo que no T5, 6/9 (66,67%) aves apresentaram lesões graves e 3/9 (33,33%) moderadas.

Em relação ao grau das lesões, foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), mas não entre os dias após a inoculação em cada tratamento ($p > 0,05$), evidenciando que o tempo não foi um fator agravante na severidade da lesão, ao menos nas primeiras 120 horas pós-inoculação. Todos os tratamentos diferiram-se do controle negativo (T1), mas não diferiram entre si, evidenciando que as cepas APEC 046, LBUEL-A33, LBUEL-A34 e APEC 046 associada a LBUEL-A33 foram capazes de desenvolver grau de lesões similares.

As aves referentes aos tratamentos T2, T3, T4 e T5 apresentaram lesões macroscópicas típicas de celulite na região do peito, caracterizadas pela presença de exsudatos caseosos e hemorragias já em 24 horas pós-inoculação (Figura 1). Algumas aves também apresentaram concomitantemente congestão e sufusões na musculatura do peito, petéquias, equimoses e edemas. As cepas APEC 046, LBUEL-A33 e LBUEL-A34 foram recuperadas de todas as lesões em 24 e 72 horas pós-inoculação.

Figura 1 – Perfil das lesões de celulite ocasionadas pelas cepas utilizadas na indução experimental *in vivo*.



Presença de Placas caseosas (↓) e hemorragias (▼) no tecido subcutâneo, 24 horas após o desafio. (A) T1 – controle negativo (PBS); (B) T2 – Controle positivo (APEC 046); (C) T3 - *P. mirabilis* com maior potencial de virulência (LBUEL-A33); (D) T4 – *P. mirabilis* com menor potencial de virulência (LBUEL-A34); (E) T5 – Infecção mista (APEC 046 + LBUEL-A33).

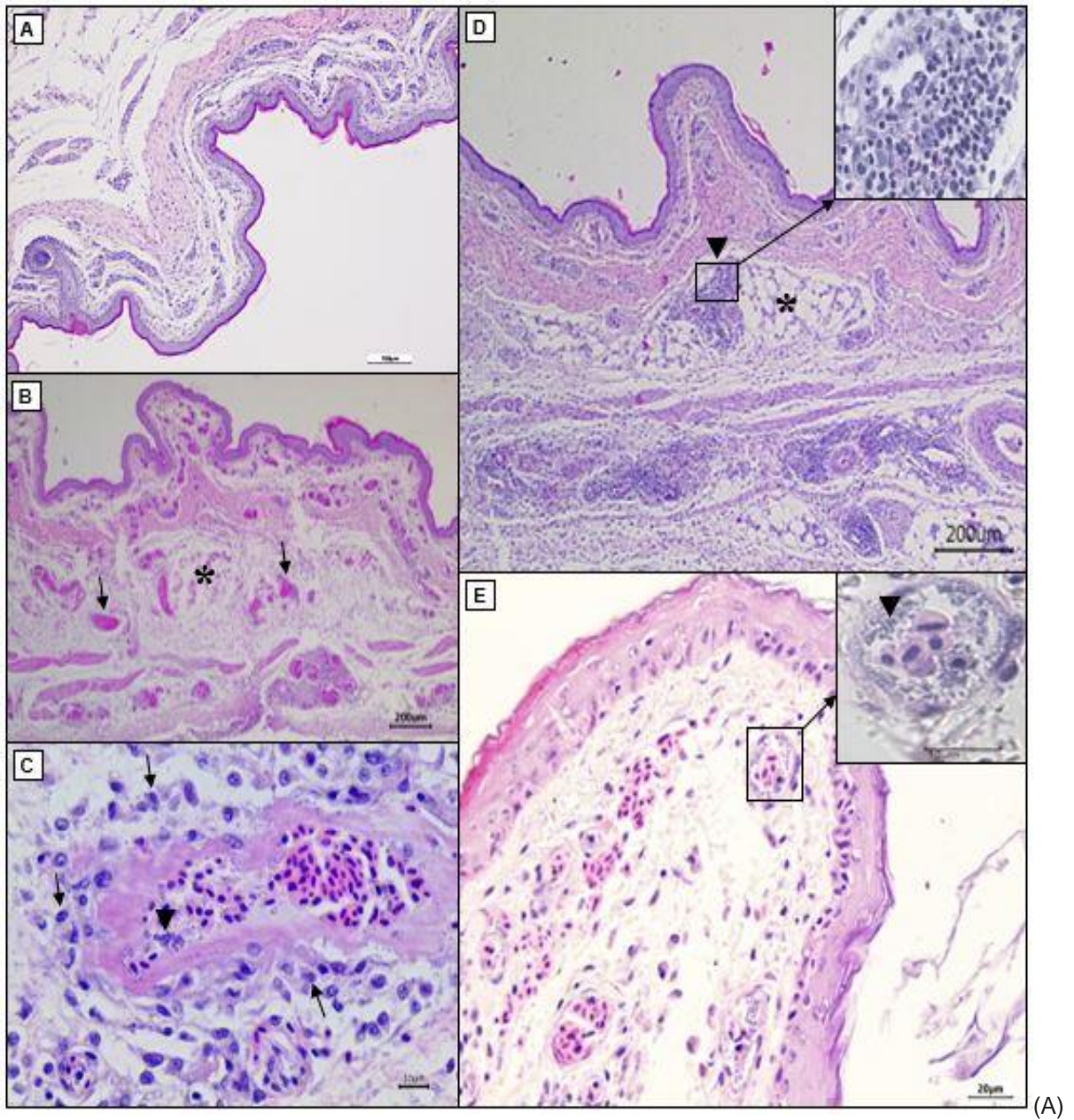
3.2 Avaliação histopatológica

A avaliação microscópica revelou que os fragmentos de pele e músculo peitoral do grupo controle negativo (T1) não apresentaram alterações patológicas (Figura 2A e 3A). Na pele das aves do grupo controle positivo (T2), foi possível observar a presença de edema intersticial difuso acentuado, congestão de vasos sanguíneos (Figura 2B), infiltrado inflamatório histiocitário perivascular e êmbolos bacterianos dentro do vaso sanguíneo (Figura 2C). Além disso, foi possível observar a derme com uma extensa área de necrose caracterizada por infiltrado heterofílico, difusa presença de bactérias Gram-negativas intralesionais circunscritas por infiltrado histiocítico e difusa presença de bactérias Gram-negativas no interstício com acentuada presença de êmbolos bacterianos (Dados não mostrados). O músculo do peito apresentou necrose focalmente extensa e moderada das fibras musculares, presença de infiltrado inflamatório (Figura 3B) e colônias bacterianas em meio a restos celulares de uma fibra muscular necrosada (Figura 3C).

A pele das aves inoculadas com a cepa LBUEL-A33 (T3) apresentou edema moderado e infiltrado histiocitário na derme (Figura 2D). Também foi possível observar a presença de infiltrado heterofílico e histiocítico difuso discreto na derme, necrose focal da derme caracterizada por infiltrado heterofílico, restos celulares e bactérias Gram-negativas intralesionais (Dados não mostrados). O músculo peitoral das aves apresentava discreta presença de infiltrado inflamatório no epimísio e necrose das fibras musculares (Figura 3D).

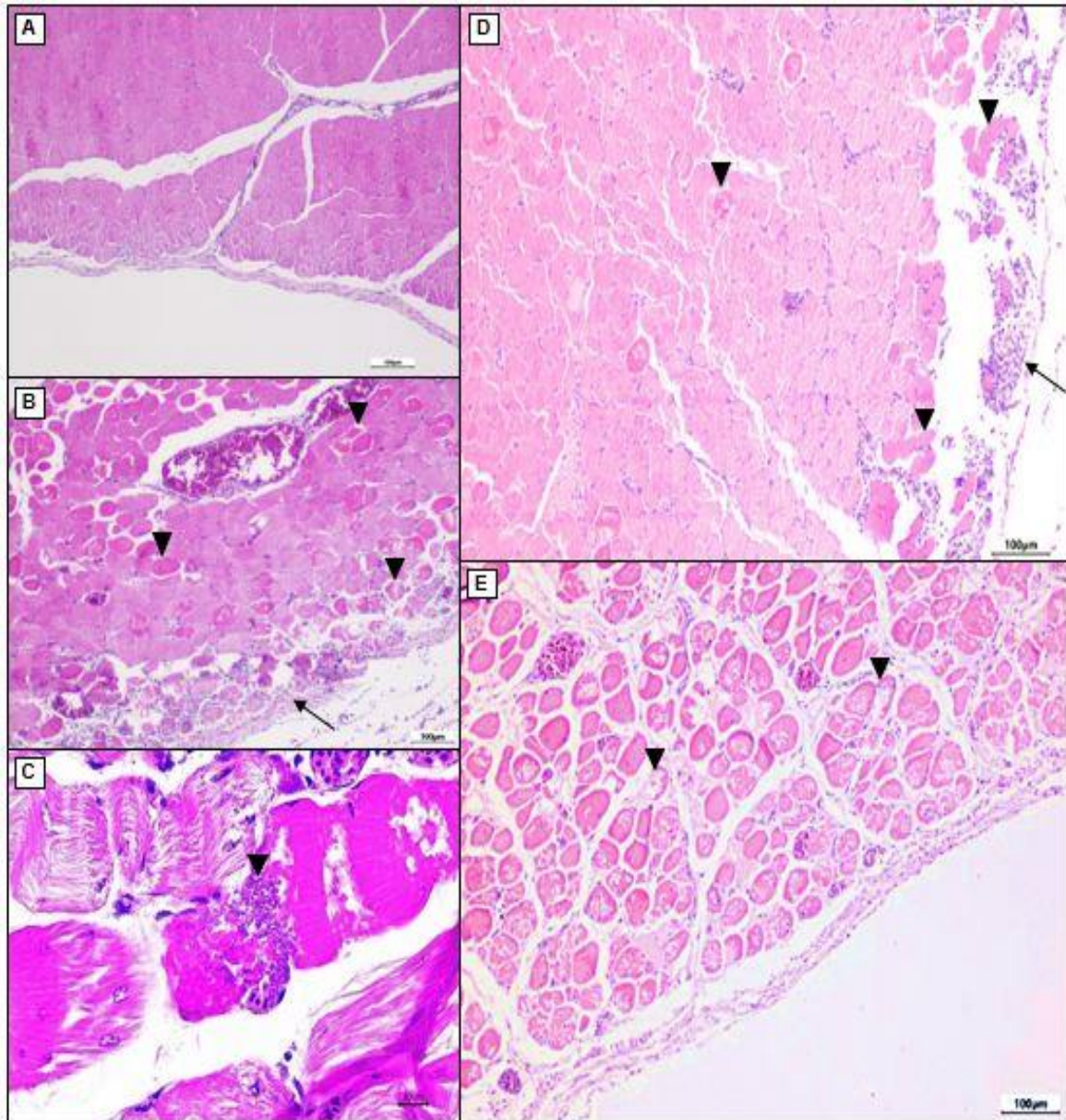
Na pele das aves do grupo infecção mista (T5) observou-se a presença de bactérias no interior de vasos sanguíneos (Figura 2E), edema intersticial difuso acentuado da derme, infiltrado histiocítico acentuado da derme e presença de bactérias Gram-negativas intralesionais (Dados não mostrados). Já o músculo peitoral apresentou uma acentuada necrose das fibras musculares (Figura 3E), infiltrado histiocítico e heterofílico discreto à moderado, presença de bactérias Gram-negativas no interstício e êmbolos bacterianos (Dados não mostrados).

Figura 2 – Alterações microscópicas encontradas na pele das aves.



Pele normal de ave do T1 (controle negativo). HE. Barra 100 μm . (B) Pele de ave do T2 (controle positivo) evidenciando congestão de vasos (\downarrow) e edema intersticial (*) difuso, acentuado. HE. Barra 200 μm . (C) Pele de ave do T2 evidenciando êmbolos bacterianos dentro do vaso (\blacktriangledown) e infiltrado inflamatório histiocitário perivascular (\downarrow). HE. Barra 10 μm . (D) Pele de ave do T3 evidenciando presença de infiltrado inflamatório (\blacktriangledown) e moderado edema (*). HE. Barra 20 μm . (E) Pele de ave do T5 evidenciando a presença de bactérias no vaso (\downarrow). HE. Barra 20 μm .

Figura 3 – Alterações microscópicas encontradas no músculo peitoral das aves.



(A) Músculo normal de ave do T1. HE. Barra 100 μm . (B) Músculo de ave do T2 evidenciando necrose focalmente extensa, moderada das fibras musculares (\blacktriangledown) e infiltrado inflamatório (\blacktriangledown). HE. Barra 100 μm . (C) Músculo de ave do T3 evidenciando colônias bacterianas em meio a restos celulares de uma fibra muscular necrosada (\blacktriangledown). HE. Barra 10 μm . (D) Músculo de ave do T3 evidenciando discreta presença de infiltrado inflamatório no epimísio (\blacktriangledown) e necrose das fibras musculares (\blacktriangledown). Barra 100 μm . (E) Músculo de ave do T5 evidenciando acentuada necrose das fibras musculares (\blacktriangledown). HE. Barra 100 μm .

4 DISCUSSÃO

Tanto a cepa LBUEL-A33 quanto a LBUEL-A34 apresentavam fatores de virulência que contribuem para a infecção em humanos, tais como fímbrias, proteases,

hemolisinas, sideróforos, adesão agregativa e capacidade de formar biofilme. Dentre esses fatores, as fímbrias são consideradas de suma importância, pois auxiliam a adesão da bactéria às células do hospedeiro (ARMBRUSTER et al., 2018). As fímbrias Mannose-resistant *Proteus-like* (MR/P), *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) e *uroepithelial cell adhesin* (UCA) contribuem significativamente para a adesão e colonização do trato urinário do hospedeiro (PELLEGRINO et al., 2013; ZUNINO et al., 2007), no qual uma alta prevalência dos genes que as codificam também já foi relatada em cães e gatos com ITU (MARQUES et al., 2018). A fímbria temperatura ambiente (ATF) não auxilia no desenvolvimento da ITU (ZUNINO et al., 2000), mas a sua expressão contribui significativamente para a adesão e formação de biofilme em superfícies abióticas (SCAVONE et al., 2016), podendo viabilizar a permanência de *P. mirabilis* no ambiente aviário, especialmente na cama de frango.

Para que a bactéria persista no hospedeiro durante o processo infeccioso, é indispensável que essa tenha a capacidade de evadir do sistema imune do hospedeiro. Em *P. mirabilis*, essa habilidade é desempenhada pela protease ZapA, responsável por degradar uma ampla variedade de proteínas estruturais e do sistema imune, tais como IgA e IgG (BELAS et al., 2004). Foi observado neste estudo que ambas as cepas de *P. mirabilis* possuíram os genes *zapA* e foram recuperadas das lesões até na última necropsia (120 horas após o desafio), evidenciando a sua persistência na celulite em frangos de corte. Já a expressão da protease PtA contribui significativamente para autoagregação bacteriana e citotoxicidade em linhagens de células renais e da bexiga (ALAMURI; MOBLEY, 2008).

As hemolisinas HpmA e HlyA são consideradas citotóxicas para uma variedade de células, pois formam poros na membrana plasmática e ocasionam a lise das células do hospedeiro (ARMBRUSTER et al., 2018). A hemolisina HpmA é frequentemente mais encontrada do que a HlyA em *P. mirabilis* uropatogênico (CESTARI et al., 2013), o que pode justificar a ausência do gene *hlyA* em ambas as cepas do nosso estudo. A presença dos genes *hmpA* e *zapA* também tem sido relatada em *P. mirabilis* causando grande escala de mortalidade em peixes (PATTANAYAK et al., 2018). O gene *ireA* é responsável por codificar um receptor de sideróforo, o qual é considerado um importante fator de virulência na obtenção de Fe⁺³ do hospedeiro para a manutenção do metabolismo bacteriano durante o processo infeccioso (SCHAFFER; PEARSON, 2015).

O fato de ambas as cepas apresentarem uma variedade de genes de virulência comumente detectados em *P. mirabilis* isolados de infecções em humanos, mas não possuírem os genes plasmidiais comumente associados à virulência de APEC, indica que *P. mirabilis* possui os seus próprios fatores de virulência que podem estar envolvidos no desenvolvimento da celulite em frangos de corte.

Esse indício pode ser sustentado pelo fato de que as funções exercidas pelos principais genes de virulência associados à APEC, tais como *iroN* e *iutA* (receptores de sideróforos) *ompT* (protease) e *hlyF* (hemolisina) também são exercidas por genes de virulência encontrados em *P. mirabilis*, tais como *ireA* (receptores de sideróforos), *ptA* e *zapA* (proteases) e *hpmA* (hemolisinas).

Poucos estudos relatam a caracterização dos fatores de virulência de *P. mirabilis* isolados de infecções em animais, o que dificulta a compreensão da prevalência desses fatores nesses isolados. Esse é o primeiro estudo que caracteriza o perfil de virulência de *P. mirabilis* isolados de lesões de celulite em carcaças de frango e comprova experimentalmente a sua capacidade em reproduzir a infecção em frangos de corte.

A colonização do tecido do hospedeiro é considerada um importante mecanismo de patogenicidade bacteriana na persistência da infecção (WANG et al., 2011). Em nosso estudo, tanto a cepa LBUEL-A33 quanto a LBUEL-A34 expressaram o padrão de adesão agregativa e a capacidade de formar biofilme, fenótipos já evidenciados em *P. mirabilis* uropatogênicos (ROCHA et al., 2007). Embora multifatorial, sabe-se que a fímbria MRP contribui significativamente para a expressão de ambos os fenótipos (ROCHA et al., 2007). Esses resultados suportam os achados de nosso estudo, pois ambas as cepas de *P. mirabilis* possuíram o gene *mrpA* e expressaram o padrão de adesão agregativa e biofilme. A formação de biofilme confere proteção às respostas imune do hospedeiro e aos antimicrobianos, contribuindo para a colonização e persistência da bactéria durante o processo infeccioso (KOSTAKIOTI et al., 2013).

O efeito citotóxico sobre células Vero representa a expressão de genes que contribuem para esse fenótipo, tais como o *hpmA*, no qual a sua expressão é responsável pela maior parte da citotoxicidade em linhagens de células renais (MOBLEY et al., 1991). Ambas as cepas de *P. mirabilis* possuíram o gene *hpmA*, mas somente a cepa LBUEL-A33 expressou o efeito citotóxico em células Vero, sugerindo

que a cepa LBUEL-A34 não expressou o gene *hpmA* *in vitro*, mas que esse pode ser expresso *in vivo* e contribuir para a citotoxicidade.

Nós acreditamos que os genes fimbriais *mrpA* e *pfmA* não contribuem significativamente para o desenvolvimento da celulite, tendo em vista que a cepa LBUEL-A34 não apresentava esses genes e ocasionou lesões estatisticamente similares a cepa LBUEL-A33 que os possuía.

Quanto ao biofilme, foi possível identificar que as lesões ocasionadas pela cepa LBUEL-A33, que expressou um biofilme muito forte, não diferiram das lesões ocasionadas pela cepa LBUEL-A34, que expressou um biofilme forte, sugerindo que essas intensidades de biofilme podem contribuir da mesma forma no desenvolvimento da celulite.

As lesões macroscópicas evidenciaram que as cepas LBUEL-A33 e LBUEL-A34 ocasionaram lesões estatisticamente similares às ocasionadas pelo controle positivo (APEC 046), uma APEC portadora dos genes *iroN*, *iutA*, *ompT*, *hlyF* e *iss* isolada de um surto de colibacilose no Norte do Paraná, Brasil. Além disso, foi possível identificar que as lesões não se agravaram quando as cepas LBUEL-A33 e APEC 046 foram inoculadas juntas. Sendo assim, *P. mirabilis* também pode ser considerado um agente primário da celulite em frangos de corte e ocasionar a condenação de carcaças, resultando em prejuízos econômicos.

Em nosso estudo, observamos que as placas caseosas e hemorragias no tecido subcutâneo das aves apareceram em 24 horas pós-inoculação (Figura 1), evidenciando que as cepas de *P. mirabilis* desenvolvem lesões de celulite rapidamente, assim como a APEC 046. Resultados similares foram encontrados por Norton et al. (1997) que utilizaram uma cepa de *E. coli* para induzir experimentalmente a celulite em frangos de corte e observaram o aparecimento de placas caseosas em 18 horas pós-inoculação. Estudos anteriores também relataram lesões macroscópicas ocasionadas por *E. coli* semelhantes às relatadas em nosso estudo, caracterizadas pela presença de placas caseosas e hemorragias (MESSIER et al., 1993; PEIGHAMBARI et al., 1995).

Em relação às alterações patológicas microscópicas, nós observamos que tanto a cepa APEC 046 quanto a LBUEL-A33 ocasionaram lesões similares, caracterizadas por edema acentuado difuso, necrose das fibras musculares, infiltrado heterofílico e histiocítico e bactérias intralesionais. Em contrapartida, a APEC 046 possuiu a capacidade de desenvolver infecção sistêmica nas aves, evidenciada pela

presença de bactérias dentro do vaso sanguíneo (Figura 2C), características não observadas no T3. As características de infecção sistêmica também foram observadas no T5 (Figura 2E), confirmando a capacidade de invasão da APEC 046, porém, mais estudos precisam ser realizados a fim de elucidar se a infecção sistêmica ocasionada por APEC pode oportunizar a invasão por *P. mirabilis*.

Dentre as alterações microscópicas, a presença de infiltrado inflamatório é frequentemente relatada nos estudos de celulite aviária ocasionada por *E. coli* (MESSIER et al., 1993; ONDERKA et al., 1997; FALLAVENA et al., 2000; PEIGHAMBARI et al., 1995). Outro estudo inoculou apenas uma citotoxina purificada de APEC e também observou a presença de infiltrado inflamatório, bem como edema na derme, similarmente ao nosso estudo (QUEL et al., 2013). Assim como na avaliação macroscópica, esses resultados confirmam que as alterações histopatológicas ocasionadas por *P. mirabilis* são características de lesões de celulite em frangos de corte.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que, as cepas de *P. mirabilis* possuem uma diversidade de fatores de virulência e a capacidade de ocasionar celulite em frangos de corte, todavia ainda não foi possível confirmar quais desses fatores contribuem para a sua patogênese na celulite aviária. Sendo assim, mais estudos avaliando a função desses fatores são necessários para compreender melhor a sua participação no desenvolvimento da celulite em frangos de corte.

REFERÊNCIAS

- Alamuri, P., Mobley, H. L., 2008. A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. *Mol. Microbiol.* 68 (4), 997–1017.
- Armbruster, C. E., Mobley, H. L. T., Pearson, M. M., 2018. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. *EcoSal Plus.* 8 (1), 1–123.
- Belas, R., Manos, J., Suvanasuthi, R., 2004. *Proteus mirabilis* ZapA Metalloprotease Degrades a Broad Spectrum of Substrates, Including Antimicrobial Peptides. *Infect. Immun.* 72 (9), 5159–5167.

Bianco, C., Balanescu, B., Cieslicka, U., Balanescu, P., Stefanov, K., Lopez, P., Hristova, N., 2016. The Shades of Avian Cellulitis in Meat-Type Chicken. RRJVS. 2 (2), 49–52.

Cestari, S. E., Ludovico, M. S., Martins, F. H., Rocha, S. P., Elias, W. P., Pelayo, J. S., 2013. Molecular Detection of HpmA and HlyA Hemolysin of Uropathogenic *Proteus mirabilis*. Curr. Microbiol. 67 (6), 703–707.

Cravioto, A., Gross, R. J., Scotland, S. M., Rowe, B., 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. 3 (2), 95–99.

Drzewiecka, D., 2016. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. Microb. Ecol. 72 (4), 741–758.

Fallavena, L. C., Moraes, H. L., Salle, C. T., Silva, A. B., Vargas, R. S., Nascimento, V. P., Canal, C. W., 2000. Diagnosis of skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses – a microscopic and macroscopic study. Avian Pathol. 29 (6), 557–562.

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

Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., Nolan, L. K., 2008. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) virulence for use as a rapid diagnostic tool. J. Clin. Microbiol. 46 (12), 3987 – 3996.

Konowalchuk, J., Speirs, J. L., Stavric, S., 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 18 (3), 775–779.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S. J., 2013. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 3 (4), 1–23.

Kwieceńska-Piróg, J., Bogiel, T., Skowron, K., Wieckowska, E., Gospodarek, E., 2014. *Proteus mirabilis* biofilm - Qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. Braz. J. Microbiol. 45 (4), 1423–1431.

Macklin, K. S., Norton, R. A., McMurtrey, B. L., 1999. Scratches as a component in the pathogenesis of avian cellulitis in broiler chickens exposed to cellulitis origin

Escherichia coli isolates collected from different regions of the US. Avian Pathol. 28 (6), 573–578.

Marques, C., Belas, A., Aboim, C., Trigueiro, G., Cavaco-Silva, P., Gama, L. T., Pomba, C., 2018. Clonal relatedness of *Proteus mirabilis* strains causing urinary tract infections in companion animals and humans. Vet. Microbiol. 228, 77–82.

Messier, S., Quessy, S., Robinson, Y., Devriese, L. A., Homme, J., Fairbrother, J. M., 1993. Focal Dermatitis and Cellulitis in Broiler Chickens: Bacteriological and Pathological Findings. Avian Dis. 37 (3), 839–844.

Mobley, H. L., Chippendale, G. R., Swihart, K. G., Welch, R. A., 1991. Cytotoxicity of the HpmA hemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular epithelial cells. Infect. Immun. 59 (6), 2036–2042.

Murakami, J., Kishi, K., Hirai, K., Hiramatsu, K., Yamasaki, T., Nasu, M., 2000. Macrolides and clindamycin suppress the release of Shiga-like toxins from *Escherichia coli* O157:H7 in vitro. Int. J. Antimicrob. Agents. 15 (2), 103–109.

Nataro, J. P., Deng, Y., Cookson, S., Cravioto, A., Savarino, S. J., Guers, L. D., Levine, M. M., Tacket, C. O., 1995. Heterogeneity of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Demonstrated in Volunteers. J. Infect. Dis. 171 (2), 465–468.

Nolan, L.K., Barnes, H.J., Abdul-Aziz, T.A., Logue, C.M., Vaillancourt, J.P., 2015. Colibacillosis. In: Brugère-Picoux, J., Vaillancourt, J.-P. (Eds.), Manual of Poultry Diseases. AFAS, Paris, France, pp. 301–315.

Norton, R. A., Bilgili, S. F., McMurtrey, B. C., 1997. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. Avian Dis. 41 (2), 422–428.

Onderka, D. K., Hanson, J. A., McMillan, K. R., Allan, B., 1997. *Escherichia coli* associated cellulitis in broilers: correlation with systemic infection and microscopic visceral lesions, and evaluation for skin trimming. Avian Dis. 41 (4), 935–940.

Pattanayak, S., Kumar, P. R., Sahoo, M. K., Paul, A., Sahoo, P. K., 2018. First field-based evidence of association of *Proteus mirabilis* causing large scale mortality in Indian major carp farming. Aquaculture, 495, 435–442.

Pearson, M. M., Sebahia, M., Churcher, C., Quail, M. A., Seshasayee, A. S., Luscombe, N. M., Abdallah, Z., Arrosmith, C., Atkin, B., Chillingworth, T., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabbinowitsch, E., Walker, D., Whithead, S., Thomson, N. R., Rather, P. N., Parkhill, J., Mobley, H. L. T., 2008. Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. J. Bacteriol. 190 (11), 4027–4037.

- Peighambari, S. M., Julian, R. J., Vaillancourt, J. P., Gyles, C. L., 1995. *Escherichia coli* Cellulitis: Experimental Infections in Broiler Chickens. *Avian Dis.* 39 (1), 125–134.
- Pellegrino, R., Scavoane, P., Umpiérrez, A., Maskell, D. J., Zunino, P., 2013. *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. *Pathog. Dis.* 67 (2), 104–107.
- Poulsen, L. L., Bisgaard, M., Jorgensen, S. L., Dideriksen, T., Pedersen, J. R., Christensen, H., 2018. Characterization of *Escherichia coli* causing cellulitis in broilers. *Vet. Microbiol.* 225, 72–78.
- Quel, N. G., Aragão, A. Z., Salvadori, M. R., Farias, A. S., Joazeiro, P. P., Santos, L. M., Sá, L. R., Ferreira, A. J., Yano, T., 2013. Cellulitis lesions in broiler chickens are induced by *Escherichia coli* Vacuolating Factor (ECVF). *Vet. Microbiol.* 162 (2-4), 866–872.
- Rocha, S. P., Elias, W. P., Cianciarullo, A. M., Menezes, M. A., Nara, J. M., Piazza, R. M., Silva, M. R., Moreira C. G., Pelayo, J. S., 2007. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51 (2), 319–326.
- Scavone, P., Iribarnegaray, V., Caetano, A. L., Schlapp, G., Härtel, S., Zunino, P., 2016. Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *Pathog. Dis.* 74 (5), 1–9.
- Schaffer, J. N., Pearson, M. M., 2015. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol. Spectr.* 3 (5), 1–39.
- Wang, S., Xia, Y., Dai, J., Shi, Z., Kou, Y., Li, H., Bao, Y., Lu, C., 2011. Novel roles for autotransporter adhesin AatA of avian pathogenic *Escherichia coli*: colonization during infection and cell aggregation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63 (3), 328–338.
- Yu, J., Kaper, J. B., 1992. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 6 (3), 411–417.
- Zunino, P., Geymonat, L., Allen, A. G., Legnani-Fajardo, C., Maskell, D. J., 2000. Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29 (2), 137–143.
- Zunino, P., Sosa, V., Schlapp, G., Allen, A. G., Preston, A., Maskell, D. J., 2007. Mannose-resistant *Proteus*-like and *P. mirabilis* fimbriae have specific and additive roles in *P. mirabilis* urinary tract infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51 (1), 125–133.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se com o presente trabalho que *P. mirabilis* isolados de carcaças de frango representam um potencial zoonótico à saúde do consumidor, tendo em vista que esses possuem uma diversidade de fatores de virulência comumente detectados em isolados clínicos humanos, além de serem multirresistentes aos antimicrobianos. Sendo assim, é de suma importância que o consumidor tenha cautela ao manusear e preparar a carne de frango e que realize um processo de desinfecção dos equipamentos de cozinha após o seu preparo, a fim de evitar o contato, contaminação cruzada e uma possível infecção alimentar por este patógeno. Além disso, foi possível concluir com o nosso estudo que *P. mirabilis* possui a capacidade de desenvolver lesões de celulite em frangos de corte estatisticamente similares às lesões ocasionadas pela cepa APEC 046.