



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

BRUNO HENRIQUE DIAS DE OLIVA

MONITORAMENTO LONGITUDINAL DE *Proteus mirabilis*
E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS EM GRANJAS DO NORTE DO
PARANÁ

LONDRINA

2025

BRUNO HENRIQUE DIAS DE OLIVA

**MONITORAMENTO LONGITUDINAL DE *Proteus mirabilis*
E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS EM GRANJAS DO NORTE DO
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Microbiologia da Univer-
sidade Estadual de Londrina para obtenção
do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato
da Rocha

**LONDRINA
2025**

BRUNO HENRIQUE DIAS DE OLIVA

**MONITORAMENTO LONGITUDINAL DE *Proteus mirabilis*
E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS EM GRANJAS DO NORTE DO
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Microbiologia da Univer-
sidade Estadual de Londrina para obtenção
do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Renata K. T. Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Alexandre Oba
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 11 de Abril de 2025.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para este trabalho, que marca o fim da minha jornada pela UEL até então. Jornada esta que começou em 2019, com a paciência e orientação do professor Sérgio Rocha, que me aceitou e me ensinou desde o início. Agradeço também à professora Renata Kobayashi, que foi muito além de uma simples parceira de projeto e se dedicou para que este trabalho acontecesse da melhor forma possível. Agradeço ainda ao professor Alexandre Oba, que, caso não estivesse disposto a colaborar, todo o tema do meu mestrado teria sido diferente. Agradeço também à Aurora Coop, que disponibilizou as amostras das granjas.

Obrigado, Ione, minha mãe, que sempre exigiu disciplina, dedicação e estudos a 1000%, assim como ela mesma faz todos os dias. Obrigado, Juarez, meu pai, que sempre me surpreende ao tentar resolver os problemas de forma eficiente (preguiçosa). Obrigado, Carol, por sempre me fazer acordar para a realidade e obrigado Raul, meu sobrinho, que traz vida e energia para a casa. Obrigado, Eva, minha cachorra, que acompanhou a escrita desse trabalho mais do que qualquer um. Obrigado, Gabriella, que está ao meu lado todos os dias, mesmo quando longe, e mostra diariamente seu companheirismo e sua determinação (embora ela não perceba). Obrigado, Meire, minha sogra, que me acolheu e apoia tanto a mim quanto à Gabi. Obrigado aos gatos Sirius, Bolinha, Catarina e Cassandra, que conversam melhor do que muita gente. Ao restante da minha família, também agradeço, tios, tias, primos e primas que sempre me perguntam sobre o antibiótico que tomaram ou vão tomar.

Agradeço aos pós-graduandos do LABAC: Gustavo, Luana Carvalho, Arthur e Luana K., por sempre me ajudarem, seja na construção de artigos, nos experimentos, nas piadas, no café ou em qualquer outra coisa que vira assunto no laboratório. Obrigado aos estagiários, os que ficam e os que vão, e sempre me ouvem contra a vontade, em especial Bianca e Bruna. Obrigado, Schoeps, por fazer o que tem que ser feito sem reclamar (muito), seja PCR, mexer no R ou escrever. Obrigado, Danilo, que foi meu parceiro de isolamento nos sábados e domingos. Não foi fácil. Obrigado às minhas parceiras da graduação, Geovana, Isabolla e Débora, que, por motivos que fogem da razão, o grupo ***** segue de pé. Obrigado também ao meu amigo Miguel, que sempre me acompanha, desde os tempos da escola.

*“Eu sou um cientista, uma vez que faço
algo, quero fazer outra coisa.”
Clifford Stoll*

DE OLIVA, B. H. D.. **Monitoramento longitudinal de *Proteus mirabilis* e seus fatores de virulência e resistência a antimicrobianos em granjas do norte do Paraná.** 2025. 64f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

RESUMO

Este estudo investigou a prevalência e as características de *Proteus mirabilis* em diferentes etapas da produção avícola, com foco na circulação da bactéria em granjas. *P. mirabilis*, um bacilo Gram-negativo e patógeno oportunista, é conhecido por causar infecções, especialmente no trato urinário, e por sua crescente resistência antimicrobiana. Além disso, *P. mirabilis* também é uma causa de celulite aviária, e potencialmente subnotificada devido aos padrões clínicos semelhantes a outras espécies. A hipótese de que animais de criação, como frangos, possam ser fontes de disseminação da bactéria é respaldada por estudos que identificaram *P. mirabilis* em carne de frango, embora a prevalência em granjas avícolas no Brasil ainda seja pouco explorada. O objetivo principal do estudo foi elucidar a circulação da bactéria em diferentes estágios da produção aviária, avaliando sua prevalência e as características fenotípicas e genotípicas de resistência e virulência. Ao todo, 135 amostras foram coletadas longitudinalmente em nove granjas, incluindo matrizes, galpões com pintainhos recém-chegados e galpões com aves adultas. Foram analisados *swabs* cloacais de aves, amostras de ração, água, insetos como *Alphitobius diaperinus*, e amostras da cama de frango. O isolamento bacteriano foi realizado utilizando meios seletivos e a identificação foi confirmada por testes bioquímicos. A resistência antimicrobiana foi avaliada por disco-difusão com 18 antimicrobianos, e a produção de ESBL foi investigada. Os resultados mostraram uma prevalência geral de 31,11% de *P. mirabilis*, com maior prevalência em matrizes (35,55%) e galpões de corte (53,33%), enquanto não foram detectados isolados em pintainhos recém-chegados. Insetos como *A. diaperinus* foram identificados como portadores frequentes da bactéria. A análise estatística revelou que granjas sem uso de antimicrobianos e com cama de palha de arroz apresentaram maior chance de isolamento da bactéria. Observou-se também uma alta resistência a enrofloxacino, ácido nalidíxico e sulfametoxazol, além de cepas produtoras de ESBL (28,57%) e de uma alta proporção de cepas multirresistentes (42,85%). A maioria dos isolados (83,33%) formou biofilme forte, possivelmente associado com a permanência da bactéria nas granjas. A análise molecular identificou genes de virulência (*zapA* e *pmfA*) em todos os isolados, e genes de resistência, como *qnrD* (resistência a quinolonas) e *bla*_{CTX-M-2} (resistência a cefalosporinas de amplo espectro), também estavam presentes em cepas resistentes. O teste de mutabilidade à fosfomicina revelou alta variabilidade nas cepas, com algumas apresentando alta mutabilidade. A análise de invasão celular mostrou que 60% das cepas sensíveis à gentamicina eram invasivas, com maior proporção de cepas não invasivas em granjas sem tratamento antimicrobiano. Os nossos resultados indicam que a presença de *P. mirabilis* em granjas do Paraná está associada ao uso de antimicrobianos e à presença do inseto *A. diaperinus* como possível reservatório da bactéria. A resistência antimicrobiana é um risco, assim como a formação de biofilme e a presença de múltiplos fatores de virulência. O estudo reforça a necessidade de monitoramento contínuo de *P. mirabilis* nas granjas avícolas, devido aos seus possíveis impactos para a saúde animal, para os produtores e para

os consumidores, destacando a importância de estratégias para o controle da resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: ESBL. Risco zoonótico. Enterobactéria.

DE OLIVA, B. H. D.. Longitudinal monitoring of *Proteus mirabilis* and its virulence and antimicrobial resistance factors in chicken farms in Paraná. 2025. 64p. Master's Thesis (Master in Science in Computer Science) – State University of Londrina, Londrina, 2025.

ABSTRACT

This study investigated the prevalence and characteristics of *Proteus mirabilis* at different stages of poultry production, focusing on the circulation of the bacterium within poultry farms. *P. mirabilis*, a Gram-negative bacillus and opportunistic pathogen, is known to cause infections, particularly in the urinary tract, and has been increasingly associated with antimicrobial resistance. Additionally, *P. mirabilis* is a cause of avian cellulitis, possibly being underreported, due to its similar clinical presentations with other species. The hypothesis that farm animals, such as chickens, could be sources of bacterial spread is supported by studies identifying *P. mirabilis* in chicken meat, though its prevalence in poultry farms in Brazil remains underexplored. The main objective of this study was to elucidate the circulation of the bacterium at different stages of poultry production, assessing its prevalence and the phenotypic and genotypic characteristics of resistance and virulence. Samples were collected longitudinally from nine farms, including breeders, brooding houses with newly arrived chicks, and houses with adult birds. Cloacal swabs from birds, feed, water, insects such as *Alphitobius diaperinus*, and bedding samples were analyzed. Bacterial isolation was performed using selective media, and identification was confirmed through biochemical tests. Antimicrobial resistance was assessed by disk diffusion with 18 antibiotics, and ESBL production was investigated. The results revealed an overall prevalence of *P. mirabilis* of 31.11%, with the highest prevalence in breeder farms (35.55%) and broiler houses (53.33%), while no isolates were detected in newly arrived chicks. Insects like *A. diaperinus* were identified as frequent carriers of the bacterium. Statistical analysis showed that farms without antibiotic use and with rice straw bedding had a higher likelihood of isolating the bacterium. A high resistance to enrofloxacin, nalidixic acid, and sulfamethoxazole was observed, along with a significant proportion of multidrug-resistant strains (42.85%) and ESBL producers (28.57%). Most isolates (83.33%) formed strong biofilms, possibly associated with this organism's persistence in broiler farms. Molecular analysis identified virulence genes (*zapA* and *pmfA*) in all isolates, and resistance genes such as *qnrD* (quinolone resistance) and *bla_{CTX-M-2}* (resistance to broad-spectrum cephalosporins) were present in resistant strains. The fosfomycin mutability test revealed high variability among the strains, with some showing high mutability. Cell invasion analysis showed that 60% of gentamicin-sensitive strains were invasive, with a higher proportion of non-invasive strains found in farms without antimicrobial treatment. Our results indicate that the presence of *P. mirabilis* in poultry farms in Paraná is associated with the use of antimicrobials and the presence of the insect *A. diaperinus* as a potential reservoir of the bacterium. Antimicrobial resistance presents a risk, as does biofilm formation and the presence of multiple virulence factors. This study underscores the need for continuous monitoring of *P. mirabilis* in poultry farms, given its potential impact on animal health, producers, and consumers, emphasizing the importance of strategies to control antimicrobial resistance.

Keywords: ESBL. Zoonotic risk. Enterobacteria

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa de calor e informações sobre o isolamento	35
Figura 2 – Unidades Formadoras de Colônia por cm^2	36
Figura 3 – Rede Bayesiana construída a partir das resistências observadas	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Proibições vigentes de uso de antimicrobianos na avicultura.	22
Tabela 2	– Distribuição total amostras positivas para <i>P. mirabilis</i>	32
Tabela 3	– Regressão logística sobre a prevalência de <i>P. mirabilis</i> em relação à cama de aviário e ao tratamento com antimicrobianos	33
Tabela 4	– Antimicrobianos excluídos da rede bayesiana com base na correlação tetracórica	34
Tabela 5	– Tabela de razões de chances entre os nodos da rede bayesiana	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ITUs	Infecções no Trato Urinário
ESBL	β -Lactamase de Espectro Estendido
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
PPT	Piperacilina associada a Tazobactam
AMC	Amoxicilina associada a Clavulanato
AMP	Ampicilina
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CAZ	Ceftazidima
CRO	Ceftriaxona
CTF	Ceftiofur
CPM	Cefepime
ATM	Aztreonam
ERT	Ertapenem
ENO	Enrofloxacino
CIP	Ciprofloxacino
LEV	Levofloxacino
NAL	Ácido Nalidíxico
NOR	Norfloxacino
GEN	Gentamicina
FOS	Fosfomicina
SUT	Sulfametoxazol
BIC	CrITÉrio de Informação Bayesiano

DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
OMS	Organização Mundial da Saúde
BHI	Caldo Cérebro Coração
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato
TSB	Caldo de Soja Trípico
APEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Aviária

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Características de <i>P. mirabilis</i>	17
2.1.1	<i>P. mirabilis</i> , ITUs e patogenicidade	17
2.1.2	Resistência de <i>P. mirabilis</i> a antimicrobianos	18
2.1.2.1	Resistência de <i>P. mirabilis</i> a β -lactâmicos	19
2.1.2.2	Resistência de <i>P. mirabilis</i> a quinolonas	19
2.1.2.3	Resistência de <i>P. mirabilis</i> a outras classes de antimicrobianos	20
2.2	Produção e consumo de frango no Brasil	20
2.2.1	Uso de antimicrobianos na avicultura	21
2.2.2	Resistência e disseminação bacteriana na avicultura	23
2.3	Métodos estatísticos para análise de epidemiologia de resistência bacteriana	23
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivos específicos	26
3.2.1	Isolar e determinar a prevalência de <i>P. mirabilis</i> nas granjas;	26
3.2.2	Investigar fenotípica e genotipicamente os principais fatores de virulência dos isolados;	26
3.2.3	Investigar fenotípica e genotipicamente os principais fatores de resistência dos isolados;	26
3.2.4	Identificar possíveis fatores de risco microbiológico com base nas características das granjas.	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Amostragem	27
4.2	Isolamento e identificação bacteriana	27
4.3	Teste de sensibilidade a antimicrobianos	28
4.4	Avaliação da formação de biofilme	28
4.5	Extração de DNA e detecção de genes de virulência e resistência	28
4.6	Teste de mutabilidade de resistência a fosfomicina	29
4.7	Teste de invasão	29
4.8	Análises estatísticas	30
4.8.1	Regressões logísticas	30

4.8.2	Rede bayesiana	30
5	RESULTADOS	32
5.1	Amostragem e prevalência de <i>P. mirabilis</i>	32
5.2	Características fenotípicas e correlação de resistências a anti- microbianos	33
5.3	Avaliação de formação de biofilme	33
5.4	Deteção de genes de virulência	34
5.5	Deteção de genes de resistência	34
5.6	Teste de mutabilidade à fosfomicina	35
5.7	Rede Bayesiana	36
5.8	Teste de invasão	37
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO A – QUESTIONÁRIO	64

1 INTRODUÇÃO

Proteus mirabilis é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, móvel e pertence à família Morganellaceae [1, 2]. Essa espécie pode ser encontrada no ambiente, como em solos e águas [3], além de habitarem comensalmente o trato gastrointestinal de diversos animais como répteis, mamíferos e aves [4]. Apesar disso, *P. mirabilis* é responsável por múltiplas infecções oportunistas [5]. Como patógeno oportunista, esta bactéria é capaz de causar diferentes tipos de infecções, como em mucosas, em feridas, em queimaduras e principalmente no trato urinário [2]. As infecções no trato urinário (ITUs) estão entre as mais comuns, e causam danos e prejuízo econômico todos os anos [6]. *P. mirabilis* pode ser, de acordo com a região, a segunda maior causa de ITUs, atrás apenas de *Escherichia coli* [7, 8].

Além disso, *P. mirabilis* é associado com ITUs graves, ou seja, aquelas que levam o hospedeiro a necessitar de hospitalização e cateterização [5], podendo contribuir para a piora de até metade das ITUs associadas a cateteres, dependendo da região [9]. Outro fator preocupante é a crescente resistência a antimicrobianos presente nesse patógeno. Na região de Londrina, cepas de *P. mirabilis* adquiridas de ITU na comunidade mostraram-se mais resistentes com o passar do tempo, com um salto de quatro vezes no número de cepas consideradas multirresistentes [10, 11, 12]. Além da resistência adquirida, essa espécie ainda é intrinsecamente resistente a tetraciclinas, nitrofuranos e polimixinas [13], antimicrobianos frequentemente usados em ITUs como alternativas à quinolonas e β -lactâmicos [14].

Uma das hipóteses de disseminação dessa enterobactéria é através de animais de criação, como bovinos e frangos [15]. Estudos já estabeleceram que é possível recuperar isolados de *P. mirabilis* em carne de frango [16, 17]. Pesquisas também têm associado produtos cárneos com ITUs causadas por *E. coli*, também pertencente à ordem Enterobacterales [18, 19, 20]. De forma similar, nosso grupo de pesquisa demonstrou, no sul do Brasil, cepas clonais de *P. mirabilis* foram isoladas de carne de frango e de pacientes com ITU adquiridas na comunidade [21] e suas altas resistências a antimicrobianos [12].

Além disso, estabelecemos que *P. mirabilis* é capaz de causar celulite aviária [22], uma infecção que causa lesões na pele de aves, gerando danos na saúde animal e prejuízos ao produtor [23]. Pelas nossas estimativas, *P. mirabilis* pode ser um importante causador dessa infecção e por vezes subnotificado, graças aos sinais clínicos iguais aos de *E. coli* [22, 16], e a presença de genes de virulência similares aos de *E. coli* patogênica aviária (APEC) [24].

Esses fatos corroboram com a hipótese que *P. mirabilis* pode apresentar um im-

portante risco zoonótico, e com o crescimento mundial no consumo de carne de frango [25], há também o aumento da necessidade de monitoramentos longitudinais na produção, algo que vêm sido feito para bactérias como *Salmonella spp.* [26] e *E. coli* [27, 28], mas até o momento, poucos trabalhos do tipo abordam a prevalência de *P. mirabilis* na criação de frangos de corte [29], e no Brasil, nenhum foi feito de forma longitudinal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características de *P. mirabilis*

Proteus mirabilis é a bactéria mais estudada e clinicamente relevante do gênero *Proteus* [2]. Descrita em 1885 por Hauser, a denominação do gênero é uma referência ao personagem mitológico grego Proteu, que tinha a habilidade de mudar de forma, assim como as bactérias do gênero *Proteus* exibem duas fisiologias características: *swimmer* e *swarmer* [30, 4]. Células *swimmer* são bastonetes convencionais, e recebem este nome pois são encontradas em culturas e ambientes líquidos. Em condições específicas, como na presença de superfícies sólidas, as células de *P. mirabilis* podem passar por uma diferenciação, aumentando seu comprimento em mais de 10 vezes, junto com uma hiper-expressão flagelar. Essas características permitem um movimento coordenado de exame, possibilitando a rápida expansão e movimentação [31]. *P. mirabilis* é considerada um patógeno oportunista, sendo principalmente responsável por ITUs [5]. No entanto, essa espécie é amplamente distribuída em animais (onde pode causar infecções ou agir de forma comensal) e no ambiente, seja por contaminação ou participação em processos de decomposição [3].

2.1.1 *P. mirabilis*, ITUs e patogenicidade

As ITUs são uma das infecções mais comuns no mundo [6]. Elas podem ser classificadas em não complicadas e complicadas. As ITUs não complicadas afetam indivíduos sem fatores de risco, sendo mais prevalentes em mulheres. Já as ITUs complicadas ocorrem quando há algum fator agravante, como obstruções urinárias, anormalidades fisiológicas ou anatômicas no trato urinário, imunossupressão, rins transplantados, presença de pedras nos rins, gravidez, entre outros [32]. *P. mirabilis* é responsável tanto por ITUs não complicadas quanto complicadas, além de estar fortemente associada a ITUs em pacientes que necessitam de cateterização [6].

Além de sua alta relevância clínica, com *P. mirabilis* sendo reportada como a terceira causa mais comum de ITUs na capital do Paraná [8], essa bactéria possui diversos fatores de virulência que aumentam a gravidade das infecções. No início da colonização, *P. mirabilis* utiliza uma variedade de adesinas, como: fímbria *Proteus*-like manose resistente (MR/P), fímbria *Proteus mirabilis* (PMF), adesina celular uroepitelial (UCA) e fímbria temperatura ambiente (ATF) [33]. Todas essas adesinas, exceto a ATF, contribuem para a colonização e infecção de diversos tecidos no trato urinário, desde a uretra até os rins [34, 35, 36]. Embora a ATF aparentemente não tenha um papel relevante nas infecções,

34 especula-se que ela auxilia na adesão em ambientes abióticos e na formação de biofilmes
35 [37].

36 Após a colonização e adesão, *P. mirabilis* utiliza diversos outros mecanismos viru-
37 lentos. Um dos mais importantes é a urease, uma enzima que catalisa a hidrólise da ureia
38 presente na urina, liberando amônia e CO₂, o que resulta na alcalinização do ambiente [9].
39 Esse aumento no pH favorece a formação de precipitados de magnésio e cálcio, que podem
40 evoluir para cristais de apatita e estruvita. Esse fenômeno é particularmente problemá-
41 tico em cateteres urinários, pois os cristais contribuem para a formação de um biofilme
42 cristalino que pode obstruir o cateter, exigindo sua troca frequente e gerando impactos
43 negativos financeiros e para a saúde do paciente [5]. Além disso, a amônia criada nesse
44 ambiente pode prejudicar outras espécies bacterianas, ajudando *P. mirabilis* a competir
45 com elas [38].

46 Outro aspecto importante é a capacidade de *P. mirabilis* de adquirir ferro, um
47 elemento essencial para o metabolismo bacteriano. Em mamíferos, o ferro raramente está
48 disponível livremente, o que torna os mecanismos de captação de ferro cruciais para a
49 sobrevivência bacteriana [39]. Estudos genômicos e experimentos *in vivo* demonstraram
50 que *P. mirabilis* possui sistemas de captação de ferro, como a produção de sideróforos,
51 moléculas que possuem alta afinidade por ferro [40, 41]. A produção de sideróforos também
52 é característica de cepas de APEC, o que destaca sua importância em ambientes avícolas
53 [42].

54 Além disso, *P. mirabilis* possui enzimas capazes de hidrolisar uma ampla gama
55 de moléculas. A metaloprotease ZapA, por exemplo, pode clivar imunoglobulinas (IgG
56 e IgA) e outros peptídeos [43]. A enzima PtA também atua como protease e tem uma
57 ação autoaglutinadora, o que contribui para a destruição de células eucarióticas durante a
58 infecção [44]. Quando presente na corrente sanguínea, *P. mirabilis* pode exibir atividade
59 hemolítica, frequentemente devido à hemolisina Hpma [45].

60 2.1.2 Resistência de *P. mirabilis* a antimicrobianos

61 O uso de antimicrobianos é fundamental para o tratamento de infecções, mas a
62 resistência a esses medicamentos representa um desafio. Em termos gerais, cepas multir-
63 resistentes, resistentes a 3 ou mais classes de antimicrobianos, estão associadas a maiores
64 taxas de mortalidade e morbidade, embora essa correlação não seja sempre observada [46].
65 No caso de *P. mirabilis*, estudos com cepas responsáveis por ITUs e infecções sanguíneas
66 não encontraram essa relação [47, 48]. De qualquer forma, a resistência a antimicrobianos
67 limita as opções terapêuticas disponíveis, e cepas resistentes podem transferir genes, o que
68 contribui para a disseminação dessa resistência entre outras bactérias, agravando ainda
69 mais o problema.

70 2.1.2.1 Resistência de *P. mirabilis* a β -lactâmicos

71 Os β -lactâmicos representam a classe mais antiga e diversa de antimicrobianos e
 72 agem ligando-se covalentemente às peptidoglicano sintetases, enzimas essenciais para a
 73 síntese da parede celular bacteriana, o que leva à morte celular. A principal forma de
 74 resistência a esses antimicrobianos é a produção de β -lactamases, enzimas capazes de
 75 hidrolisar o anel lactâmico presente nas moléculas de β -lactâmicos [49]. Essas enzimas
 76 podem ser classificadas de várias maneiras, porém as β -lactamases de espectro estendido
 77 (ESBL) merecem destaque. Embora não exista uma definição unânime sobre ESBLs, elas
 78 são geralmente descritas como enzimas capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas
 79 (até a 4ª geração), mas não cefamicinas (como cefoxitina), nem os carbapenêmicos. Além
 80 disso, as ESBLs são frequentemente inibidas por compostos como o tazobactam e ácido
 81 clavulânico [50, 51, 49].

82 As cepas de *P. mirabilis* produtoras de ESBLs representam um desafio para a
 83 medicina, uma vez que os genes responsáveis por essas enzimas estão localizados, em
 84 sua maioria, em plasmídeos. Entre as diferentes enzimas β -lactamases identificadas em *P.*
 85 *mirabilis*, as mais prevalentes são as codificadas pelos genes SHV, TEM e CTX-M, em
 86 ordem crescente de importância [52]. A enzima TEM era a mais comumente detectada [53,
 87 54], mas, nos últimos 25 anos, houve uma explosão na disseminação de genes que codificam
 88 para a enzima CTX-M [55]. As CTX-M são agrupadas em classes com diversas variantes,
 89 e apresentam uma distribuição global crescente. Cada variante apresenta características
 90 distintas de resistência, e o acúmulo de múltiplas variantes pode conferir uma vantagem
 91 à bactéria.

92 Na região de Londrina, um estudo realizado entre 2016 e 2017 com cepas de *P.*
 93 *mirabilis* causadoras de ITUs não-hospitalares revelou que apenas uma cepa (0,5%) foi
 94 positiva para a produção de ESBL, com a detecção do gene *bla*_{CTX-M-9} [10]. Já em 2019,
 95 outro estudo realizado com a mesma metodologia [12] encontrou 19 cepas (9,5%) positivas
 96 para a produção de ESBL, todas do grupo CTX-M, sem a presença dos genes *bla*_{TEM} e
 97 *bla*_{SHV}. Além disso, os mesmos estudos indicaram um aumento na prevalência de cepas
 98 de *P. mirabilis* multirresistentes (MDR), que passou de 7,1% para 29,5%.

99 Outros mecanismos de resistência a β -lactâmicos também foram relatados em *P.*
 100 *mirabilis*, como enzimas do tipo AmpC [56] e carbapenemases do tipo OXA [57], embora
 101 com prevalência significativamente menor em comparação aos mecanismos anteriormente
 102 mencionados.

103 2.1.2.2 Resistência de *P. mirabilis* a quinolonas

104 As quinolonas representam uma classe de antibióticos que tem ganhado impor-
 105 tância clínica nos últimos 30 anos, especialmente no tratamento de ITUs. Esses fármacos

atuam inibindo o superenovelamento do DNA, por meio da ligação com enzimas como a DNA-girase [58]. Mutações cromossômicas em genes responsáveis por essas enzimas, como *gyrA* ou *parC*, podem alterar a estrutura da DNA-girase de forma que o antibiótico perca sua eficácia. Tais mutações já foram descritas em *P. mirabilis* [59, 60].

Além disso, genes plasmidiais denominados *qnr* foram identificados em *P. mirabilis*. Esses genes codificam proteínas QNR, que protegem as enzimas topoisomerasas e conferem resistência à ação das quinolonas. A disseminação desses genes ocorre principalmente por meio de plasmídeos [58]. Embora diversas variantes tenham sido relatadas, o gene *qnrD* parece ser o mais prevalente [12, 61]. Algumas cepas também apresentam o gene *aac(6')-Ib*, que confere resistência não apenas a algumas fluoroquinolonas, mas também a gentamicinas [62].

2.1.2.3 Resistência de *P. mirabilis* a outras classes de antimicrobianos

P. mirabilis apresenta resistência intrínseca a diversas classes de antimicrobianos, como tetraciclina, tigeciclina, nitrofurantoína e polimixina [13]. Em relação a outras substâncias, como as fosfomicinas, a resistência pode ser mediada por genes plasmidiais, como *fosA3* [63], ou pela alta mutabilidade do organismo a esse antimicrobiano [64]. A resistência a gentamicinas, embora menos abordada, é associada principalmente ao gene *aac(6')-Ib* [65]. No caso das sulfonamidas, os principais mecanismos de resistência são conferidos pelos genes plasmidiais *sul1* e *sul2* [66].

2.2 Produção e consumo de frango no Brasil

Em 2023, o Brasil manteve uma tendência de crescimento contínuo na produção e no consumo de frango que se estende por 10 anos, e consolidou-se como o maior exportador mundial de produtos avícolas [67]. Neste ano, o Brasil produziu mais de 14 milhões de toneladas de carne de frango, com um valor de produção bruto de 91,6 bilhões de reais. Apesar de ser o principal exportador global de frango, 65,35% da produção nacional é destinada ao mercado interno, com uma média anual de consumo de 45 kg por habitante. O estado do Paraná se destaca nesse cenário, representando 39,47% de todos os abates de frango no país, uma quantidade de aproximadamente três vezes superior à do segundo colocado [67].

Esse crescimento pode ser atribuído a fatores como a popularização do frango como uma fonte de proteína magra, a qualidade da carne e, principalmente, os preços mais acessíveis [68]. O menor custo também tem razões claras: períodos curtos de engorda (em média, 40 dias após o nascimento), a alta capacidade de reprodução das aves e a otimização do uso de espaço [69, 70].

A maior parte da produção de frango no Brasil é realizada por meio de sistemas intensivos, onde os animais são criados em grandes quantidades de forma otimizada. Embora relativamente uniforme, cada granja apresenta características específicas que atendem às necessidades do produtor. A cama de frango, utilizada para reduzir o atrito das aves com o chão, exerce grande influência na qualidade de vida dos animais. Materiais como maravalha, sabugo de milho triturado, palha de arroz e outros materiais alternativos podem ser utilizados [71]. Camas com menor capacidade de absorção e com pontas duras estão mais associadas a machucados e infecções nas aves, mas frequentemente são mais baratas e acessíveis [72].

Outro fator distintivo é a diferenciação no manejo, que varia conforme o tipo de granja. As matrizes (aves reprodutoras) vivem por um período muito maior do que os frangos de corte e possuem um controle sanitário mais rigoroso. Já os frangos de corte, que têm uma vida média de 40 dias, têm menos tempo, o que pode exigir tratamentos mais intensivos (para garantir que fiquem saudáveis rapidamente para o abate) e um controle de fluxo de pessoas mais flexível, em comparação com as matrizes, que seguem protocolos de biossegurança mais rigorosos [73, 74].

2.2.1 Uso de antimicrobianos na avicultura

A produção e manejo de frangos trazem a tona um risco: a disseminação de bactérias. A otimização do espaço é extremamente importante para a produção, mas pode trazer problemas tanto para o bem-estar dos animais, quanto para o aumento de contaminação, sujeira e consequentemente bactérias patogênicas [75].

O período curto de engorda, além de ser um processo estressante [68], era caracterizado pelo uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, prática que vêm sendo cada vez mais regulamentada e restrita mundialmente [76]. No Brasil, o Ministério de Agricultura e Pecuária (MAPA) desde 1985, realiza instruções normativas para proibições de diversos antimicrobianos com fins de melhoramento da eficiência de produção. A maioria das classes de antimicrobianos são de uso terapêutico exclusivo, ou seja, só podem ser usados caso algum animal esteja doente. As principais proibições vigentes são descritas na Tabela 1.

De acordo com a revisão de Silva *et al.* [77] sobre o uso de antimicrobianos na produção animal na América do Sul, o Brasil foi classificado como “forte” nas categorias de prescrição, uso terapêutico, uso metafilático e no monitoramento de antimicrobianos, pois seguem praticamente todas as diretrizes de organizações como: Organização Mundial da Saúde, Organização Mundial de Saúde Animal e Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. Entretanto, categorias como: uso preventivo, uso como promotores de crescimento e uso sem prescrição, a classificação foi de “intermediário”. No

Tabela 1 – Proibições vigentes de uso de antimicrobianos na avicultura.

Antimicrobiano	Proibição	Referência
Organoclorados	Proibir a fabricação, a importação e a comercialização de produtos de uso veterinário à base de organoclorados, principalmente, DDT, LINDANE, e HCH Total	Portarias nº 329/1985 e 191/1986
Avoparcina	Proíbe, em todo o território nacional, o uso da substância antimicrobiana avoparcina com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal	Of. Circ. DFPA nº 047/1998
Arsenicais e Antimoniais	Proibido o uso na fabricação de produtos destinados à alimentação animal, com finalidade de promotores de crescimento ou melhoradores de desempenho animal.	Portaria nº 31, de 29 de janeiro de 2002
Cloranfenicol e Nitrofuranos	Proibida a fabricação, manipulação, fracionamento, comercialização, importação e uso para todos os animais e insetos.	Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003
Carbadox	Proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso de produtos destinados à alimentação animal contendo a substância química denominada Carbadox.	Instrução Normativa nº 35, de 14 novembro de 2005
Violeta Genciana (Cristal Violeta)	Proibido o registro e a autorização para a fabricação, importação, comercialização e uso como aditivo antifúngico na alimentação animal.	Instrução Normativa nº 34, de 13 de setembro de 2007
Anfenicóis, Tetraciclinas, β -lactâmicos (Benzilpenicilâmicos e Cefalosporinas), Quinolonas e Sulfonamidas Sistêmicas	Proibida a utilização como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais.	Instrução Normativa nº 26, de 09 de julho de 2009
Espiramicina e Eritromicina	Proibida a importação, fabricação e uso como aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal.	Instrução Normativa, de 18 de maio de 2012
Sulfato de Colistina	Proibida a importação e fabricação como aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal.	Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016
Tilosina, Lincomicina e Tiamulina	Proibida a importação, fabricação, comercialização e uso como aditivos melhoradores de desempenho.	Instrução Normativa nº 1, de 13 de janeiro de 2020

176 país, a maioria dos aditivos antimicrobianos melhoradores de desempenho foram proibidos
 177 (MAPA), porém alguns continuam permitidos, dos quais 2 (bacitracina e virginamicina)

estão na lista de antimicrobianos importantes para saúde humana estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) [78].

2.2.2 Resistência e disseminação bacteriana na avicultura

O uso de antimicrobianos, mesmo que regulado, tem efeitos sobre o perfil de sensibilidade da população bacteriana de frangos e afins, aumentando a resistência [79]. Além disso, o fenômeno de co-seleção pode selecionar bactérias resistentes a classes de uso humano. Esse processo envolve a transferência de genes que conferem resistência a certos antimicrobianos, sob pressão seletiva de uma outra classe, e já foi reportado na avicultura [80, 81].

Um dos principais problemas relacionados à disseminação de genes de resistência é a contaminação da carne destinada aos consumidores. Diferentemente de outras fontes, como suínos e bovinos, o sistema gastrointestinal dos frangos está localizado próximo aos músculos, o que aumenta o risco de contaminação cruzada durante o abate. Embora essa seja a hipótese mais aceita, faltam evidências conclusivas que a confirmem ou refutem [82]. Ainda que o mecanismo de contaminação não esteja claro, múltiplos trabalhos já constatarem a presença de patógenos resistentes, tanto na cadeia de produção aviária, quanto no produto final ao redor do mundo [83, 84, 85, 86, 87], inclusive no Brasil [27, 28, 26].

P. mirabilis era considerado uma bactéria comensal nesse ambiente, sendo por vezes considerada como um contaminante para análises bacteriológicas, com métodos específicos desenvolvidos para evitar seu isolamento [88]. No entanto, nos últimos anos, mais pesquisas têm considerado o potencial risco que esse microrganismo representa. Estudos já investigaram sua virulência [89], resistência fenotípica [90] e genotípica [29], relação clonal [21] e até mesmo sua patogenicidade para as próprias aves [91, 22]. Ainda assim, a maioria dos trabalhos focam no isolamento de *P. mirabilis* em carcaças e produtos finais, e poucos investigam a disseminação em granjas diretamente.

2.3 Métodos estatísticos para análise de epidemiologia de resistência bacteriana

A resistência bacteriana em estudos epidemiológicos é, em sua maioria, medida de forma binária, classificando as bactérias como sensíveis ou resistentes. Esse método é amplamente utilizado devido à sua praticidade, especialmente quando se lida com centenas ou até milhares de isolados bacterianos. Entretanto, existem abordagens mais precisas, como o uso das concentrações inibitórias ou bactericidas mínimas, a consideração de fenó-

tipos intermediários ou a análise de curvas de dose-resposta, que oferecem uma estimativa mais detalhada da resistência bacteriana.

Independentemente do método adotado para estudar a resistência, ainda não há consenso na literatura sobre as melhores práticas para a realização de análises estatísticas. Embora essa falta de uniformidade possa ser vista como uma vantagem, pois permite flexibilidade para lidar com as especificidades de cada estudo, também torna mais difícil encontrar diretrizes claras e pode levar ao uso de técnicas inadequadas. Os artigos que serão citados abaixo são relacionados a resistência bacteriana na avicultura, para fins de exemplificação, mas em linhas gerais, eles se aplicam para outras situações como na clínica humana e na criação de outros animais.

Muitos trabalhos limitam-se à estatística descritiva, como a apresentação de prevalências e porcentagens [92, 93]. O teste de qui-quadrado de independência é um dos testes descritivos mais utilizados [94, 95], por não exigir suposições sobre distribuições e ser de fácil interpretação. Esse teste permite identificar associações entre categorias (como, por exemplo, entre resistências ou entre um fator de risco e uma resistência). No entanto, ele não oferece informações sobre a força da associação nem permite fazer inferências causais [96].

Outro método exploratório útil, especialmente em situações com muitas variáveis, como nas análises de resistomas, é a técnica de Análise de Correspondência (CA) e suas variantes [97]. Embora não seja amplamente utilizada, essa técnica é eficaz para reduzir a dimensionalidade dos dados e permite uma visualização clara das resistências e outras características associadas [98, 99].

A descrição é essencial, mas a inferência permite um monitoramento mais preciso, e eventualmente predições, permitindo mais informações para possíveis intervenções. Métodos como a regressão logística são comumente empregados para analisar dados de resistência binária [100, 12, 27, 28], especialmente quando se dispõe de dados adicionais, como fatores de risco (por exemplo: fonte de isolamento, uso prévio de antibióticos, etc.). A regressão logística é vantajosa por sua flexibilidade, podendo ser adaptada a diversas situações e permitindo o cálculo de razões de chances, que são amplamente utilizadas na epidemiologia.

Contudo, o uso de modelos de regressão logística em dados de resistência apresenta algumas limitações. A resistência bacteriana a múltiplos antibióticos tende a ser altamente correlacionada, o que pode violar o pressuposto de ausência de multicolinearidade, resultando em estimativas incorretas. Além disso, é desafiador definir de maneira clara quais variáveis devem ser tratadas como dependentes ou independentes, uma vez que as resistências a diferentes antibióticos podem ser simultaneamente causas e consequências umas das outras. Para mitigar essas limitações, pode-se agrupar resistências fortemente correlacionadas ou utilizar abordagens que envolvem múltiplos modelos, alternando as variáveis

249 dependentes e independentes. Além disso, dados com separação acentuada e amostras
250 pequenas também podem introduzir vieses e interferir nos resultados [101].

251 Com o avanço do poder computacional, métodos bayesianos, como a construção de
252 redes bayesianas, surgem como uma alternativa promissora para mitigar as desvantagens
253 dos métodos tradicionais. As redes bayesianas e as redes bayesianas aditivas permitem
254 a incorporação de conhecimento prévio (*a priori*) de especialistas, além de possibilitar
255 o manejo de dados altamente correlacionados. Com cautela, esses modelos também po-
256 dem ser usados para explorar relações causais [102, 103], incluindo dados relacionados à
257 resistência bacteriana [104, 105, 106, 107].

258 Além da regressão logística e das redes bayesianas, outros métodos de aprendi-
259 zado de máquina têm sido cada vez mais implementados, especialmente em estudos com
260 grandes volumes de isolados. Esses algoritmos são capazes de identificar padrões ocultos
261 e auxiliar na predição de resistência bacteriana com base em variáveis como espécie, fonte
262 de isolamento e outros fatores relevantes [108, 109, 110].

1 **3 OBJETIVOS**

2 **3.1 Objetivo geral**

3 Pretende-se com esse estudo, elucidar melhor a circulação de *P. mirabilis* em di-
4 versos estágios da criação de frangos de corte, determinando onde a sua prevalência é
5 mais acentuada. Além disso, investigar os fatores de virulência e resistência de isolados
6 circulantes nas granjas, e encontrar possíveis padrões entre as características das bactérias
7 em relação às etapas de produção aviária.

8 **3.2 Objetivos específicos**

9 **3.2.1** Isolar e determinar a prevalência de *P. mirabilis* nas granjas;

10 **3.2.2** Investigar fenotípica e genotipicamente os principais fatores de virulência dos
11 isolados;

12 **3.2.3** Investigar fenotípica e genotipicamente os principais fatores de resistência dos
13 isolados;

14 **3.2.4** Identificar possíveis fatores de risco microbiológico com base nas características
15 das granjas.

1 4 MATERIAIS E MÉTODOS

2 4.1 Amostragem

1 A amostragem foi realizada de forma longitudinal, acompanhando o ciclo produ-
2 tivo de cada lote: iniciou-se nas matrizes, seguiu para as granjas com pintainhos recém-
3 chegados — pertencentes ao mesmo lote das matrizes — e finalizou nas mesmas granjas,
4 já com as aves adultas, com idade média de 40 dias. Esse processo foi repetido três vezes,
5 totalizando amostragens em três unidades de matrizes, três granjas com pintainhos e,
6 posteriormente, nas mesmas três granjas com aves adultas.

7 Em todos os estabelecimentos estudados, a mesma quantidade de amostras foi
8 recolhida: 11 *swabs* cloacais de aves selecionadas aleatoriamente, 1 amostra ambiental
9 obtida por meio de propé arrastado ao longo do chão, 25 g de ração, 25 g de água e 25
10 insetos da espécie *Alphitobius diaperinus* (cascudinho). Os *swabs* foram acondicionados
11 em meio *Cary-Blair*, e todas as amostras foram armazenadas em caixas térmicas com gelo
12 reciclado, sendo processadas em até 24 horas após a coleta. Ao final, foram obtidas 45
13 amostras nas unidades de matrizes, 45 nas granjas com pintainhos e 45 nas granjas com
14 aves adultas, totalizando 135 amostras.

15 Em cada ponto de amostragem, foi aplicado um questionário padronizado, com o
16 objetivo de coletar informações sobre aspectos da produção que pudessem estar relacio-
17 nados à prevalência, virulência e resistência a antimicrobianos de *P. mirabilis*.

18 4.2 Isolamento e identificação bacteriana

19 O isolamento foi conduzido com um protocolo previamente estabelecido, com mo-
20 dificações [27]. Todas as amostras foram incubadas em água peptonada tamponada, em
21 uma proporção de 1:10, por 24 horas à 37°C. Em seguida, uma alíquota de 1 mL foi trans-
22 ferida para 9 mL de caldo BHI (DifcoTM, EUA) suplementado com polimixina, de forma
23 que a concentração final do antimicrobiano fosse de 8 mg/L, novamente incubado por 24
24 horas a 37°C. O crescimento resultante foi inoculado em ágar Xilose Lisina Desoxicolato
25 (XLD) (DifcoTM, EUA), através do método do esgotamento, e mais uma incubação foi
26 realizada por 24 horas. Colônias suspeitas de *P. mirabilis* foram selecionadas e triadas
27 bioquimicamente com os meios EPM, MILi (PROBACTM, BRA), Citrato de Simmons
28 (DifcoTM, EUA) e ágar Fenilalanina (DifcoTM, EUA), e após a confirmação da espécie,
29 foram estocadas.

30 4.3 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

31 O perfil de sensibilidade dos isolados foi avaliado pela técnica de disco-difusão, se-
 32 guindo os parâmetros estabelecidos pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI)
 33 [13]. Ao todo, 18 antimicrobianos, de uso clínico humano e veterinário foram testados: Pi-
 34 peracilina associada a Tazobactam (PPT), Amoxicilina associada a Clavulanato (AMC),
 35 Ampicilina (AMP), Cefalotina (CFL), Cefoxitina (CFO), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona
 36 (CRO), Ceftiofur (CTF), Cefepime (CPM), Aztreonam (ATM), Ertapenem (ERT), En-
 37 rofloxacino (ENO), Ciprofloxacino (CIP), Levofloxacino (LEV), Ácido Nalidíxico (NAL),
 38 Norfloxacino (NOR), Gentamicina (GEN), Sulfametoxazol (SUT). Isolados classificados
 39 como resistentes a ERT foram submetidos ao teste modificado de Hodge para a detecção
 40 de carbapenemases [111].

41 O fenótipo de cepas produtoras de ESBLs também foi avaliado, conforme precon-
 42 zado pelas normas do CLSI, através da técnica de aproximação de discos. O teste utilizou
 43 os antimicrobianos: Amoxicilina associada a Clavulanato, Aztreonam, Cefepime, Ceftri-
 44 axona e Ceftazidima. O isolado foi considerado ESBL quando apresentava distorção em
 45 algum halo de inibição

46 4.4 Avaliação da formação de biofilme

47 Todos os isolados foram submetidos a um ensaio de formação de biofilme realizado
 48 em placas de poliestireno de 96 poços utilizando cristal violeta. Para os cálculos e clas-
 49 sificações, o protocolo estabelecido por Kwiecinska-Piróg *et al.* [112] foi utilizado. Como
 50 controle negativo, utilizou-se caldo de soja tríptico (TSB) (DifcoTM). Para um controle
 51 positivo de formação de biofilme a cepa *E. coli* 042 [113] foi empregada. As leituras de ab-
 52 sorbância foram realizadas em um espectrofotômetro ELx800 (Biotek[®]) no comprimento
 53 de onda de 570 nm para classificar o biofilme em ausente, fraco, moderado, forte ou muito
 54 forte.

55 4.5 Extração de DNA e detecção de genes de virulência e resis- 56 tência

57 A extração do DNA foi realizada através do método da fervura e choque térmico.
 58 A pesquisa dos genes foi feita pela técnica de reação em cadeia da polimerase. Ao todo, 8
 59 genes de virulência (*mrpA* [114], *pmfA* [16], *ucaA* [16], *atfA* [115], *hpmA* [116], *ireA* [16],
 60 *ptA* [16] e *zapA* [16]) foram selecionados para a detecção. Eles foram escolhidos com base
 61 na sua relevância na patogênese e sua prevalência.

Para a detecção de genes de resistência, 10 genes foram pesquisados (*bla*_{CTX-M-1} [117], *bla*_{CTX-M-2} [117], *bla*_{CTX-M-8} [117], *bla*_{CTX-M-9} [117], *qnrD* [118], *aac(6')-Ib* [119], *sul1* [120], *sul2* [120] e *fosA3* [121] de acordo com os resultados da pesquisa do perfil de sensibilidade. Eles também foram escolhidos com base na sua relevância e prevalência na região do isolamento [12]. Duas cepas (LBUEL-A45 e LBUEL-A65) foram submetidas a pesquisa de genes dos grupos ACC, EBC, CIT, DHA, MOX e FOX [122], devido ao seu perfil (resistente a CFO, porém sensível a CTF).

4.6 Teste de mutabilidade de resistência a fosfomicina

Todos os isolados foram submetidos ao teste de mutabilidade de resistência a fosfomicina. O protocolo seguido foi o de Fonseca *et al.* [64], com modificações. A metodologia segue o mesmo padrão de um teste de disco-difusão convencional, com fosfomicina 200 µg, porém, a incubação é feita por 48 horas, a 37°. Após o crescimento, o diâmetro do halo de inibição foi medido, e as colônias dentro do halo contadas. A cepa padrão *P. mirabilis* HI4320 foi utilizada como controle normomutante [64].

4.7 Teste de invasão

O ensaio de invasão foi conduzido de acordo com Alamuri *et al.* [123], com modificações. As bactérias previamente identificadas como sensíveis à gentamicina no teste de antibiograma foram cultivadas a 37°C em caldo TSB (DifcoTM) até atingirem a saturação (aproximadamente 18 horas). As cepas de *E. coli* DH-5α e EIEC O152 foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Poços sem bactérias foram utilizados como controle de contaminação.

As células HEp-2 foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂, com uma confluência ≥ 90%, em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Gibco BRL, EUA), 2 mM de glutamina (**Sigma Chem. Co., EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (100 µg/mL, *), 100 IU/mL de penicilina (**) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Meizler Biopharma S/A, BR), em placas de poliestireno de 24 poços.

Antes da inoculação bacteriana, os poços contendo as células foram lavados 3 vezes com PBS para remover quaisquer resíduos de antibióticos. Em seguida, foram adicionados 25 µL do crescimento bacteriano em cada poço, juntamente com 475 µL DMEM sem antimicrobianos, em duplicata. A placa foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 3 horas. Após esse período, os poços foram lavados novamente com PBS para remover o excesso de bactérias. Em seguida, adicionou-se 100 µL de DMEM, suplementado com gentamicina a uma concentração final de 50 mg/L. A placa foi incubada a 37°C por mais 1 hora. Após esse período, 100 µL de Triton X-100 a 1% foi adicionado a cada poço e incubado

por 5 minutos, a fim de lisar as células eucarióticas. O conteúdo foi inoculado em ágar MacConkey, utilizando salina para diluições seriadas. O resultado foi considerado válido apenas quando ambas as replicatas apresentaram um número similar de unidades formadoras de colônias e quando os controles da placa se comportaram conforme o esperado. O resultado foi expresso de forma qualitativa, classificando a bactéria como invasiva ou não. O teste de qui-quadrado foi usado para encontrar associações entre bactérias invasivas e outras características. Os resultados devem ser sempre interpretados levando em conta que apenas bactérias sensíveis a gentamicina foram incluídas no teste.

4.8 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R versão 4.4.2. Estatísticas descritivas foram utilizadas em todos os experimentos. Quando relevante, técnicas mais específicas foram aplicadas. Quando necessário, o teste de qui-quadrado foi usado para encontrar associações.

4.8.1 Regressões logísticas

Para avaliar os fatores associados à prevalência de *P. mirabilis*, o pacote *glmulti* (1.08) foi usado para construir todos os modelos de regressão logística possíveis. Isso permitiu a análise dos fatores envolvidos com a presença de *P. mirabilis*, e a seleção do modelo mais adequado para a descrição dos dados. O critério de seleção foi o Critério de Informação de Akaike corrigido para pequenas amostras (AICc). As variáveis utilizadas na construção dos modelos foram obtidas dos questionários. Apenas variáveis relevantes e que continham informações que nenhuma outra variável trazia foram consideradas (para garantir a ausência de multicolinearidade): “Tipo de granja” (Matriz ou de Corte), “Uso de antimicrobianos nas aves” (não ou sim) e “Tipo de Cama do Aviário” (Maravalha ou Palha de Arroz). Interações entre as variáveis também foram consideradas. O pacote *performance* (v 0.12.4) foi usado para checar os pressupostos dos modelos considerados.

4.8.2 Rede bayesiana

Para investigar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das cepas, foram construídas e avaliadas redes bayesianas. As variáveis utilizadas na modelagem foram: ‘Fazenda’ (1, 2, 3, 4, 5 ou 6), ‘Tipo de Granja’ (Matrizes ou de Corte), ‘Tipo de Cama’ (Palha de Arroz ou Maravalha), ‘Tratamento’ (Não ou Sim) e os resultados do antibiograma. Para reduzir a dimensionalidade (considerando o número de bactérias, resultados redundantes do antibiograma e resistências raras), certos antibióticos foram excluídos das análises. A escolha da exclusão foi feita com base no cálculo de correlação tetracórica

129 entre as resistências. Correlações fortes (acima de 0.75) indicam que a inclusão desses re-
130 sultados seria redundante, e prejudica a interpretação dos resultados. Todas as variáveis,
131 com exceção da fazenda, são binárias.

132 O pacote *bnlearn* v5.1 foi usado para a construção da rede. Algumas informações
133 a priori foram incorporadas na análise: a variável ‘Fazenda’ não poderia ser influenciada
134 por nenhuma outra variável, e as variáveis ‘Tipo de Cama’ e ‘Tratamento só poderiam ser
135 influenciadas pela ‘Tipo de Granja’ e pela ‘Fazenda’. Para todas as demais variáveis, a es-
136 trutura da rede foi determinada exclusivamente com base nos dados. O algoritmo utilizado
137 para o aprendizado da estrutura da rede foi o *Hill-Climbing*, que consiste em adicionar,
138 remover ou inverter aleatoriamente a direção dos arcos, até que não seja possível aumen-
139 tar mais a pontuação do Critério de Informação Bayesiano (BIC). O BIC avalia o quão
140 bem a rede explica dados observados, penalizando modelos complexos, evitando assim
141 o sobreajuste. O objetivo desse processo é encontrar a estrutura que melhor represente
142 a probabilidade dos dados observados. Para aumentar a robustez da rede, foi realizado
143 um *bootstrapping* com 100.000 simulações, e a rede final foi construída utilizando apenas
144 os arcos que apareceram em 40% ou mais das redes simuladas. Além disso, foi feito um
145 *bootstrapping* de menor escala (com 10.000 simulações) para fins de comparação.

1 5 RESULTADOS

2 5.1 Amostragem e prevalência de *P. mirabilis*

3 Das 135 amostras, 42 isolados de *P. mirabilis* foram recuperados, correspondendo
4 a uma prevalência 31,11%. A Tabela 2 descreve a quantidade de isolados recuperados pelo
tipo de amostra.

Tabela 2 – Distribuição total amostras positivas para *P. mirabilis*

Fonte/Local	Matriz	Pintainhos ¹	Frangos ²	Total
Aves	11/33	0/33	16/33	27/99
Inseto	3/3	2/3	3/3	8/9
Água	0/3	0/3	1/3	1/9
Ração	0/3	0/3	1/3	1/9
Propé	2/3	0/3	3/3	5/9
Total	16/45	2/45	24/45	42/135

1: Galpão com pintainhos de 1 dia recém-chegados. 2: Mesmo galpão, analisado com as
aves já adultas, antes de serem enviadas para o abate (média de 40 dias).

5

6 A prevalência de isolados de *P. mirabilis* variou entre os tipos de granjas: apenas 2
7 isolados (4,4%) foram encontrados das 45 amostras de galpões de pintainhos, enquanto 16
8 isolados (35,55%) foram encontrados nas matrizes e 24 (53,33%) dos galpões de corte. Para
9 identificar os fatores que melhor explicavam a prevalência de *P. mirabilis*, as amostras dos
10 galpões de pintainhos foram desconsideradas, pois apresentaram apenas duas observações
11 positivas, ambas provenientes de cascudinhos e não de aves. Essa pequena proporção
12 faz com que possíveis modelos não sejam confiáveis. Assim, a variável “Tipo de granja”
13 refere-se apenas à matriz ou ao galpão com aves adultas.

14 As regressões logísticas construídas com o pacote *glmulti* permitiram identificar as
15 variáveis mais relevantes para a previsão da presença de *P. mirabilis*. A Tabela 3 descreve
16 os resultados desse modelo, que leva em conta: o tipo de cama, se houve tratamento e a
17 interação entre essas duas variáveis: amostras de estabelecimentos que continham palha de
18 arroz e não passaram por tratamento com antimicrobianos tinham 9,61 vezes mais chances
19 de isolamento de *P. mirabilis* do que amostras de granjas com cama de maravalha que
20 passaram por tratamento com antimicrobianos. A ausência da variável “Tipo de granja”
21 demonstra que as matrizes e os galpões de corte com aves adultas não tiveram diferenças
22 significativas nas chances de isolamento de *P. mirabilis*.

Tabela 3 – Regressão logística sobre a prevalência de *P. mirabilis* em relação à cama de aviário e ao tratamento com antimicrobianos

Comparação	RC ^{1,2} (IC ² 95%)
Palha de arroz/Maravalha	1,14 (0,324 – 4,01)
Tratamento/Não tratamento	0,48 (0,16 – 1,39)
Palha de arroz e Tratamento/Maravalha e Não Tratamento	9,61* (1,45 – 75,12)

1: *p<0.05;

2: RC = Razão de Chances, IC = Intervalo de Confiança

A prevalência também variou quanto à fonte de isolamento. Enquanto *P. mirabilis* foi consistentemente isolado de cascudinhos e aves, a presença de isolados na água, na ração e nos propés foi mais acentuada nos galpões de corte, mas nenhuma diferença foi estatisticamente significativa.

5.2 Características fenotípicas e correlação de resistências a antimicrobianos

Nenhum antimicrobiano foi totalmente eficaz, ou seja, pelo menos uma cepa foi resistente a cada composto testado. Do total de isolados de *P. mirabilis*, as seguintes proporções de isolados resistentes foram encontradas: PPT – 1 (2,38%), AMC – 3 (7,14%), AMP – 14 (33,33%), CFL – 21 (50%), CFO – 4 (9,52%), CAZ – 8 (19,04%), CRO – 12 (28,57%), CTF – 14 (33,33%), CPM – 11 (26,19%), ATM – 8 (19,04%), ERT – 2 (4,76%), ENO – 31 (73,8%), CIP – 16 (38,09%), LEV – 15 (35,71%), NAL – 27 (64,28%), NOR – 4 (9,52%), GEN – 7 (16,66%), SUT – 27 (64,28%). O total de cepas produtoras de ESBL segundo o teste de aproximação de disco foi de 12 (28,57%). O total de cepas consideradas MDR foi de 42,85%. Os isolados resistentes a ERT no antibiograma foram negativos no teste de Hodge. A correlação tetracórica demonstrou uma grande associação entre os antimicrobianos β -lactâmicos, bem como entre algumas quinolonas. Os números exatos estão descritos na Tabela 4.

5.3 Avaliação de formação de biofilme

Dos 42 isolados, 35 (83,33%) tiveram o biofilme classificado como forte, e 7 (16,67%) como moderado. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre a intensidade do biofilme e o local ou fonte de isolamento ($p > 0,05$).

Tabela 4 – Antimicrobianos excluídos da rede bayesiana com base na correlação tetracórica

Antimicrobiano correlacionado	Antimicrobiano excluído	Correlação tetracórica
CTF	AMP	0.93
	CFL	0.84
	CAZ	0.88
	CRO	0.93
	CPM	0.92
	ATM	0.87
	GEN	0.77
	AMC	0.62*
CIP	LEV	0.89
	NAL	0.79

*O antimicrobiano AMC não teve alta correlação com CTF, mas apresentou correlações altas a outros antimicrobianos do mesmo grupo, além de que todos os isolados resistentes a AMC foram resistentes a CTF

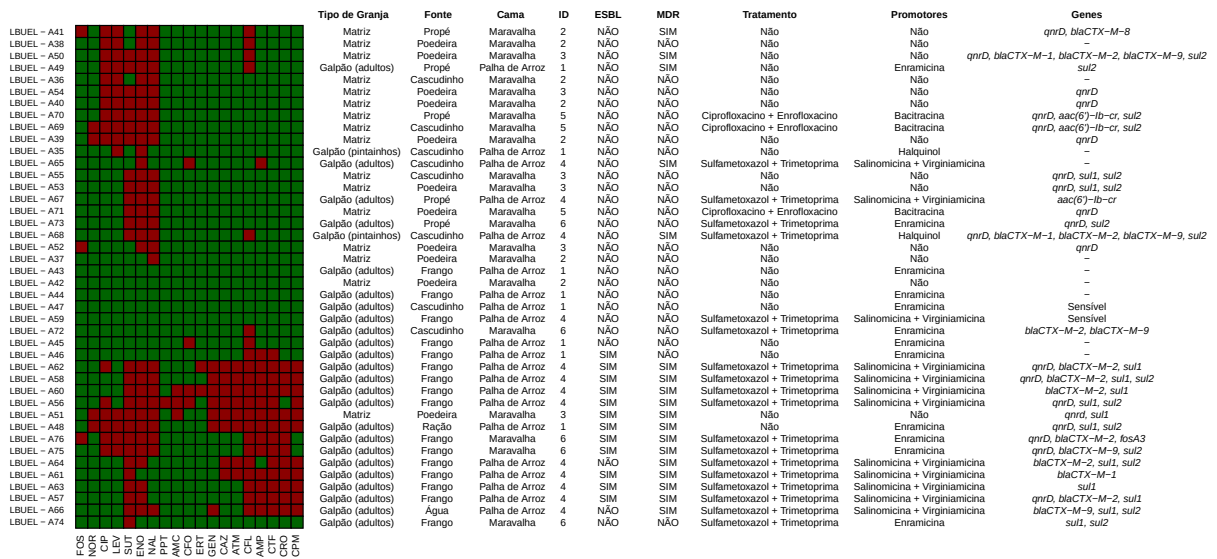
5.4 Detecção de genes de virulência

Os genes *zapA* e *pmfA* foram encontrados em todos os isolados. A prevalência dos demais genes de virulência foram: 40 (95,23%) isolados foram positivos para *ptA*, 40 (95,23%) para *mrpA*, 39 (92,85%) para *ireA*, 38 (90,47%) para *atfA*, 37 (88,09%) para *hpmA* e 26 (61,9%) para *ucaA*. O perfil homogêneo de virulência dos isolados dificulta qualquer inferência estatística. O gene *ucaA* foi avaliado, mas nenhuma relação significativa foi encontrada com a fonte ou local de isolamento ($p > 0,05$).

5.5 Detecção de genes de resistência

Dos 32 isolados resistentes a pelo menos uma quinolona, 21 (65,62%) foram positivos para o gene *qnrD*. Dos 22 isolados resistentes a algum β -lactâmico, 3 (13,64%) foram positivos para *bla*_{CTX-M-1}, 9 (40,09%) para *bla*_{CTX-M-2}, 1 (4,45%), para *bla*_{CTX-M-8}, e 5 (22,72%) para *bla*_{CTX-M-9}. Dos 32 isolados resistentes a ao menos uma quinolona e/ou gentamicina, 3 (9,375%) foram positivos para *aac6'-ic-br*. Dos 27 isolados resistentes a sulfametoxazol + trimetoprima, 13 (48,14%) possuíam o gene *sul1* e 15 (55,55%) possuíam o gene *sul2*. Apenas 1 isolado foi positivo para *fosA3*. Ambas as cepas testadas para beta-lactamases do tipo AmpC foram positivas para o grupo MOX. Detalhes se encontram na Figura 1. O mapa de calor foi construído de forma a organizar tanto as cepas quanto os antimicrobianos, agrupando aqueles com maior similaridade entre si. Isso facilita a visualização de padrões de resistência aos antimicrobianos e permite a investigação de outras características da cepa, como fonte e local de isolamento.

Figura 1 – Mapa de calor e informações sobre o isolamento

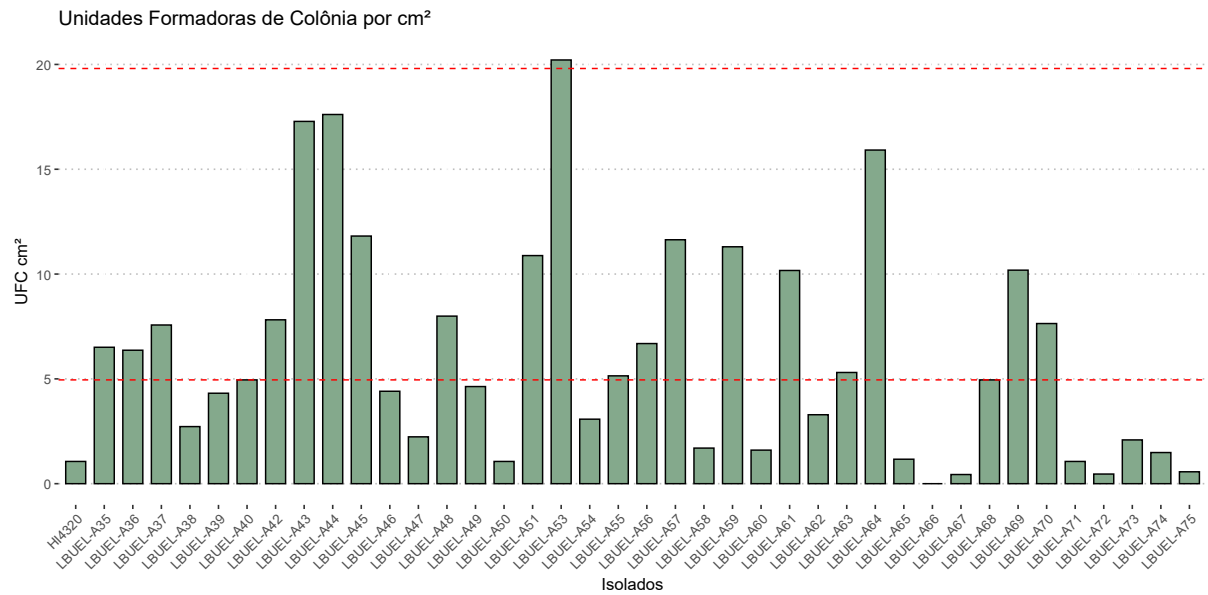


Legenda: Quadrados verdes representam sensibilidade ao antimicrobiano. Vermelhos são resistentes. Promotores de crescimento podem ser divididos em iniciais (halquinol, de 0 a 19 dias de vida) e finais (salinomomicina, enramicina ou virginiamicina, de 20-30 dias de vida). ID: identificação numérica de cada estabelecimento.

5.6 Teste de mutabilidade à fosfomicina

O teste de mutabilidade à fosfomicina revelou que a quantidade de unidades formadoras de colônia por cm^2 variou consideravelmente entre as cepas. O menor valor observado foi de 0, enquanto o maior foi de 20,21 UFC/ cm^2 . Este valor corresponde a cepa LBUEL-A53, a única que apresentou um número superior a 4 vezes a mediana (4,95) do grupo. Esse parâmetro foi estabelecido por Fonseca *et al.* [64], e serve como um primeiro indício de que este microrganismo pode ser um hipermutante. O restante dos resultados pode ser observado na Figura 2. Três cepas não possibilitaram a contagem de colônias, pelo crescimento exagerado, provavelmente por conta de resistência. Apenas uma delas foi positiva para o gene *fosA3*.

Figura 2 – Unidades Formadoras de Colônia por cm²

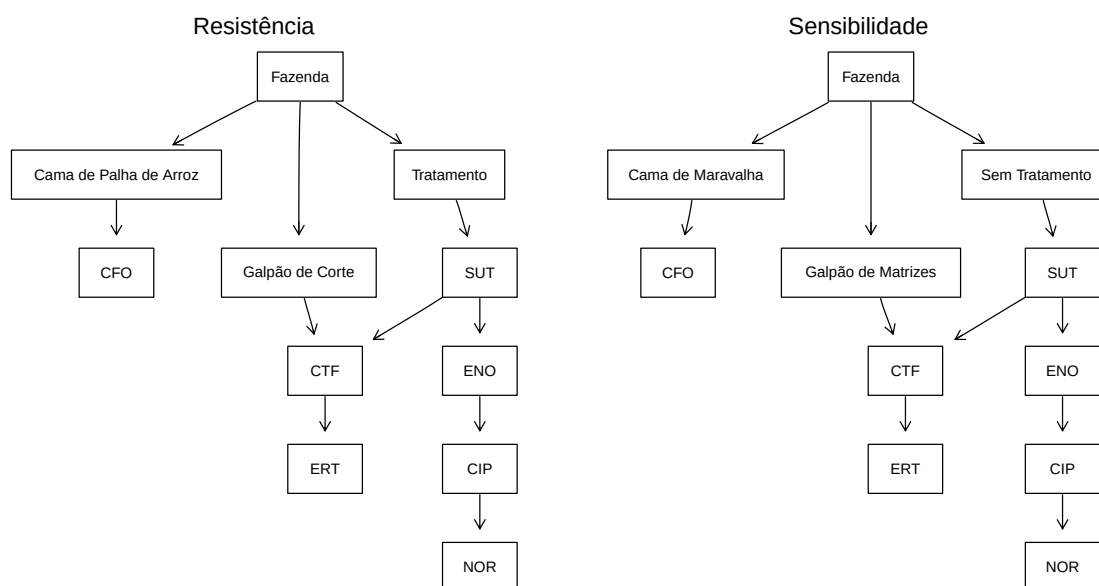


Legenda: As linhas pontilhadas representam o a mediana (4,95) e 4x a mediana (19,8)

5.7 Rede Bayesiana

A estrutura da rede bayesiana permaneceu intacta nas análises com 100 mil e 10 mil simulações, portanto, apenas os dados provenientes do teste com 100 mil foram usados para os próximos resultados. A rede revelou uma grande interconexão entre as características das granjas e antimicrobianos. As camas de palha de arroz foram mais associadas a resistência a CFO. Os galpões de corte foram mais associados a resistência aos β -lactâmicos, e o uso de tratamento com antimicrobianos aumentou a probabilidade de resistência a praticamente todos os antimicrobianos. A estrutura da rede se encontra na Figura 3. As razões de chances podem ser consultadas para a interpretação mais específica na Tabela 5.

Figura 3 – Rede Bayesiana construída a partir das resistências observadas



Legenda: As conexões entre os nós indicam associações probabilísticas entre as variáveis. A rede foi dividida para facilitar a interpretação. A rede "Resistência" demonstra como as características descritas eram associadas com maiores resistências. A rede "Sensibilidade" demonstra como as características descritas eram associadas com maiores sensibilidades. Por exemplo: O galpão de corte foi associado a uma maior resistência a CTF, enquanto o galpão de matrizes foi associado a uma maior sensibilidade, comparativamente.

Tabela 5 – Tabela de razões de chances entre os nodos da rede bayesiana

Nodo pai	Condição	Nodo filho	RC ¹	LI ²	LS ³
Tratamento	-	SUT	7,44	2,1	103
Cama	-	CFO	20,94	4,33	55,04
SUT	-	ENO	16,61	3,84	254,65
ENO	-	CIP	47,95	18,9	116
CIP	-	NFL	36,43	7,77	105
CTF	-	ERT	20,75	1,79	64,14
Tipo de fazenda	SUT = S	CTF	6,78	0,31	33,56
Tipo de fazenda	SUT = R	CTF	19,18	3,38	500

1: Razão de chances. 2: Limite inferior a 95%. 3: Limite superior a 95%.

5.8 Teste de invasão

Das 35 cepas sensíveis à gentamicina, 21 (60%) foram classificadas como invasivas. O teste de qui-quadrado não foi utilizado para comparar cepas produtivas de ESBL e MDR, pois apenas as bactérias sensíveis à gentamicina foram incluídas na análise, o que resultou em uma frequência baixa dessas duas categorias. Não foi observada associação

90 entre o local de isolamento e a invasividade das cepas. No entanto, encontrou-se uma asso-
91 ciação positiva entre as categorias "Tratamento" e a invasividade ($p < 0,005$), de forma que
92 locais que não utilizaram antimicrobianos apresentaram uma proporção significativamente
93 maior de cepas não invasivas.

1 6 DISCUSSÃO

2 Até o momento, poucos estudos investigaram a prevalência de *P. mirabilis* em
3 granjas, e nenhum deles foi realizado no Brasil. Na literatura, os valores de prevalência
4 variam entre 5% e 40%, o que se deve a três fatores principais: i) a falta de uma metodo-
5 logia de amostragem padronizada, ii) os diferentes objetivos dos estudos e iii) as variações
6 regionais.

7 Ramatla *et al.* [124] analisaram amostras de fezes de aves em granjas e reporta-
8 ram uma prevalência de 5,4%. O método de isolamento utilizado foi semelhante ao deste
9 estudo, com uso de água peptonada, porém com o uso de uma proporção de 1:3 entre
10 amostra e meio de cultura, seguido de cultura em ágar XLD. No entanto, a ausência de
11 um seletor (como a polimixina) e a alta proporção de fezes para água peptonada podem
12 ter contribuído para a baixa prevalência de *P. mirabilis*, mesmo com um grande número
13 de amostras iniciais (480 *pools* de 2400 amostras). Além disso, não houve uma análise de
14 perda de sensibilidade, que permitiria ajustar a prevalência em amostras agrupadas, e isto
15 impede uma estimativa mais precisa [125].

16 Ma *et al.* [126] também utilizaram amostras de fezes de aves em granjas, mas re-
17 portaram uma prevalência consideravelmente maior, de 39,53%. Nesse estudo, as amostras
18 foram inoculadas diretamente em ágar SS. A abordagem direta e focada no isolamento,
19 aliada a fatores regionais, pode ter levado ao aumento da prevalência observada. Por outro
20 lado, Li *et al.* [29] reportaram uma prevalência de 7,07%, e embora tenham utilizado uma
21 metodologia direta (plaqueamento da amostra em ágar MacConkey), o principal objetivo
22 do estudo era o isolamento de *E. coli*, uma bactéria naturalmente mais abundante nesse
23 ambiente, o que pode ter influenciado a prevalência observada. Além disso, Li *et al.* [29]
24 isolaram *P. mirabilis* de swabs cloacais e amostras do ar, mas não encontraram a bactéria
25 em fezes.

26 Embora esses estudos forneçam informações importantes, todos foram realizados
27 em regiões diferentes, com metodologias adaptadas aos seus objetivos. Os resultados do
28 nosso trabalho indicaram uma prevalência total de 31,11%. No entanto, ao considerar
29 apenas o local de isolamento ou focar nas amostras de aves, esse valor pode ultrapassar
30 50% (Tabela 2). Vale ressaltar que o isolamento direcionado com polimixina pode ser
31 útil para a recuperação de *P. mirabilis*, mas pode dificultar a detecção de outras espécies
32 potencialmente relevantes do ponto de vista epidemiológico.

33 Nenhuma cepa foi recuperada de pintainhos, o que não é surpreendente, já que
34 os pintainhos dependem das mães e do ambiente para adquirir sua microbiota, e em um
35 contexto de produção, não há contato com a mãe, além do ambiente ser rigoroso quanto a

higiene [127]. Como a coleta foi realizada logo após a chegada das aves ao estabelecimento, e entre os lotes a área passa por processos de desinfecção, isso parece reduzir, ao menos temporariamente, a presença de *P. mirabilis*. Cada galpão passou por um tratamento diferente (uso de cal, fermentação ou desinfetantes em combinação com calor), e todos esses métodos já foram comprovados como eficazes na diminuição de populações bacterianas em granjas [128, 129, 130].

Os resultados corroboram com a hipótese de que os cascudinhos (*A. diaperinus*) podem ser uma das principais fontes de disseminação de *P. mirabilis* em granjas. Esse microrganismo foi consistentemente recuperado do inseto no nosso trabalho, em praticamente todas as fazendas. Eles são conhecidos por abrigarem bactérias patogênicas e multirresistentes [131], inclusive *P. mirabilis* [132].

Estudos laboratoriais mostraram que *A. diaperinus* é capaz de transferir e adquirir *Salmonella enterica* através de fezes de galinhas, mesmo quando as bactérias estão internalizadas no inseto [133]. Crippen *et al.* [134] demonstraram que o microbioma desses insetos podem permanecer relativamente consistente ao longo de várias trocas de cama e animais, inclusive detectando bactérias do gênero *Proteus* em larvas de cascudinhos.

A ingestão desses insetos pelas aves poderia reintroduzir *P. mirabilis* em sua microbiota, estabelecendo um ciclo contínuo de transmissão: as fezes das aves contaminadas retornam ao ambiente, são consumidas pelos cascudinhos e perpetuam o ciclo de disseminação, potencialmente contaminando até mesmo a ração e água da granja. Esta dinâmica explicaria a ausência de *P. mirabilis* no ambiente de pintainhos recém-chegados e sua posterior abundância, especialmente nas aves.

Estratégias de controle tradicionais envolvem o uso de inseticidas, mas assim como bactérias, a erradicação é difícil, e casos de populações resistentes já foram relatados [131]. Métodos alternativos e combinados vêm sendo desenvolvidos [131], e estes poderiam auxiliar não só na redução do inseto, mas também de bactérias potencialmente patogênicas como *P. mirabilis*.

Embora a hipótese de que *A. diaperinus* seja o principal disseminador de *P. mirabilis* seja plausível, ela não explica as diferenças de prevalência observadas nos locais de isolamento com aves adultas, isto é, entre matrizes e galpões. Inicialmente, o maior rigor e biossegurança nas matrizes pode explicar porque observamos mais isolamentos em amostras das granjas de corte, porém a construção de diversos modelos de regressão logística permitiu identificar as variáveis que mais têm influência sobre a presença de *P. mirabilis* e o tipo da granja não influenciou significativamente. O modelo mais relevante demonstrou que granjas que não utilizaram tratamento com antimicrobianos e que possuíam cama de aviário composta por palha de arroz apresentaram 9,61 vezes (IC 95%: 1,45 – 75,12) mais chances de isolamento de *P. mirabilis*, em comparação com granjas com cama de maravalha e que realizaram algum tipo de tratamento com antimicrobianos

74 (Tabela 3).

75 Vale ressaltar que o tratamento mencionado refere-se ao uso de antimicrobianos
76 com fins terapêuticos, ou seja, para combater infecções. Em relação ao uso de antimi-
77 crobianos como promotores de crescimento, é importante destacar que todas as aves de
78 corte receberam esses produtos, enquanto as aves de matrizes não, portanto, a hipótese
79 de que o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento aumentaria as chances
80 de isolamento de *P. mirabilis* foi testada ao considerarmos o tipo de granja, mas não foi
81 encontrada evidência significativa para apoiar essa suposição.

82 Embora seja plausível que o uso terapêutico de antimicrobianos diminua as chances
83 de isolamento de *P. mirabilis* em granjas, essa variável só se mostrou significativa quando
84 associada ao tipo de cama utilizado. A cama de maravalha, que é considerada o padrão,
85 apresenta um custo mais elevado, enquanto a cama de palha de arroz é uma alternativa
86 mais econômica, mas com algumas desvantagens. A palha de arroz possui maior taxa
87 de evaporação, menor capacidade de retenção de umidade, e menor responsividade a
88 variações de temperatura. Além disso, há mais relatos de problemas nas pernas de aves
89 criadas com esse tipo de cama [135].

90 Miles, Rowe e Cathcart [136] evidenciaram que a cama de palha de arroz está
91 associada a uma maior produção de amônia (NH_3) em comparação à cama de maravalha,
92 devido às diferenças em suas características físico-químicas. A produção de amônia por *P.*
93 *mirabilis*, mediada pela urease, é um dos fatores que contribui para a sua competitividade
94 e vantagem sobre outros microrganismos [2], sendo investigada como um mecanismo de
95 adaptação e competição em ambientes específicos [38]. Assim, as características físico-
96 químicas da cama de palha de arroz, aliadas à presença de *P. mirabilis*, podem favorecer
97 a produção de amônia e criar um ambiente mais propício para o crescimento desse mi-
98 croorganismo, especialmente quando fatores seletivos adicionais, como os antimicrobianos
99 terapêuticos, não estão presentes. Ainda assim, mais estudos são necessários para entender
100 melhor as interações entre esses fatores e seus efeitos na prevalência de *P. mirabilis*.

101 Outro fator possivelmente relacionado à presença de *P. mirabilis* em granjas é
102 sua capacidade de formar biofilmes. Essa característica é fundamental para a persistência
103 bacteriana em ambientes desfavoráveis, como cateteres urinários [137]. Ambientes como
104 granjas, que passam por variações constantes, tratamentos e limpezas periódicas, podem
105 selecionar bactérias com maior capacidade de formar biofilmes. Nossos resultados apoiam
106 essa hipótese, uma vez que mais de 80% das cepas de *P. mirabilis* isoladas apresentaram
107 formação de biofilme forte, e o restante, moderado. Estudos realizados na mesma região
108 indicam que o perfil de biofilme de *P. mirabilis* pode variar conforme a fonte de isolamento:
109 isolados de ITUs apresentaram biofilmes fortes e muito fortes [10], o mesmo ocorrendo
110 com carne de frango [21] e carcaças de frango [16], enquanto os isolados de carne de boi
111 e porco geralmente apresentaram biofilmes fracos [21]

Assim como a formação de biofilmes, o perfil de virulência bacteriana também desempenha um papel importante no isolamento de *P. mirabilis* nesse contexto. *P. mirabilis* pode apresentar diversas fímbrias, que são essenciais para a formação de biofilmes. Em nossa pesquisa, todos os genes fimbriais investigados foram detectados em mais de 90% das cepas isoladas, com exceção do gene *ucaA*, encontrado em apenas 62% das bactérias. Outros estudos com *P. mirabilis* da mesma região apresentaram resultados semelhantes [21].

O estudo de Scavone *et al.* [37] observou que cepas mutantes incapazes de produzir a fímbria UCA formaram biofilmes mais fortes em comparação com outros mutantes, sugerindo que a presença dessa fímbria pode influenciar a estabilidade do biofilme. No entanto, em nosso estudo, observamos que 5 das 7 cepas com biofilme moderado não possuíam o gene *ucaA*, o que sugere uma ausência dessa fímbria em algumas amostras. Embora o número reduzido de cepas com biofilme moderado não permita uma análise estatística robusta, essa observação levanta uma questão interessante sobre a possível variabilidade na formação de biofilmes e o papel da fímbria UCA.

De maneira semelhante, outros genes relacionados a fatores de virulência, como proteases, hemolisinas e sideróforos, também foram identificados em proporções altas, o que reforça a homogeneidade do arsenal de virulência de *P. mirabilis*, independentemente de sua origem de isolamento [16, 10, 89]. Esses genes desempenham papéis fundamentais na colonização e nas infecções, sendo essenciais tanto para a persistência da bactéria no ambiente quanto para seu potencial de causar doenças.

Em *P. mirabilis* isolados de aves, esses genes podem ter uma função semelhante à observada em cepas de APEC, que possuem genes com funções análogas, cruciais para sua capacidade de persistir e infectar aves [23]. Esse fenômeno é particularmente relevante em granjas, onde esses genes, semelhantes aos encontrados em cepas de APEC [138], podem se espalhar rapidamente [139]. Com os dados de prevalência de *P. mirabilis* de nosso estudo e sua capacidade de causar celulite aviária [21], é plausível que essa bactéria seja prejudicial tanto para as aves quanto para os produtores. Em apoio a isso, Oliva *et al.* [24] não encontraram diferenças significativas no genoma de cepas isoladas de ambientes avícolas, clínicos humanos e de celulite aviária. Além disso, Sanches *et al.* [22] observaram que a co-infecção por *E. coli* e *P. mirabilis* em galinhas apresenta sinais clínicos semelhantes. Esses três resultados sugerem uma possível subnotificação de celulite causada por *P. mirabilis*.

Além da preocupação sobre as aves, nossos resultados sobre a prevalência de *P. mirabilis* ajudam a explicar a alta presença dessa bactéria em carnes de aves, como reportado por diversos trabalhos [140, 141, 21]. Uma vez nas granjas, especialmente na microbiota das aves, essa bactéria pode contaminar a carne durante o processo de evisceração, o que gera um risco zoonótico para os consumidores, possivelmente por meio de contaminação cruzada (manipulação inadequada do alimento cru), como discutido por Sanches *et al.*

150 [21].

151 Embora o isolamento de *P. mirabilis* seja preocupante, um fator ainda mais crítico
 152 é a seleção de bactérias resistentes. Em nosso estudo, observamos uma grande diversidade
 153 de perfis de sensibilidade a antimicrobianos, variando de cepas sensíveis a multirresisten-
 154 tes. Nenhum antimicrobiano testado foi completamente eficaz, mas aqueles considerados
 155 de último recurso, como a piperacilina associada ao tazobactam e o ertapenem, mostraram
 156 ação contra a maioria das cepas. O uso de antimicrobianos na avicultura está fortemente
 157 associado ao desenvolvimento de resistência bacteriana, um fenômeno amplamente docu-
 158 mentado [79], e que também foi observado em nosso estudo. Os testes de qui-quadrado
 159 indicaram uma relação positiva entre o uso de antimicrobianos e a presença de bactérias
 160 multirresistentes (MDR), além de bactérias produtoras de ESBL. A correlação tetracórica
 161 nos mostrou que muitas resistências estão intimamente associadas, possivelmente através
 162 de mecanismos de co-seleção intraclasse (no caso dos β -lactâmicos) e até interclasses (como
 163 a gentamicina).

164 Estas associações foram confirmadas também pela análise de rede bayesiana (Fi-
 165 gura 3), que identificou o tratamento com antimicrobianos como uma causa direta da
 166 resistência a sulfametoxazol e, indiretamente, um fator que contribui para a resistência
 167 a outros antimicrobianos, como as quinolonas. A causa indireta pode ser explicada por
 168 fenômenos de co-seleção ou pela falta de especificidade no tipo de tratamento utilizado
 169 nas análises. Em alguns casos, o tratamento não envolveu sulfametoxazol, mas sim enro-
 170 floxacino e ciprofloxacino, e ainda é possível que ambos os fatores estejam em jogo. Além
 171 disso, Leal [142] demonstrou que fluoroquinolonas, como norfloxacino e enrofloxacin, têm
 172 afinidade tanto pela cama de aviários quanto pela composição do solo brasileiro. Essa in-
 173 formação, aliada aos nossos resultados, sugere que o possível uso de antimicrobianos em
 174 ciclos anteriores poderia gerar resíduos, favorecendo a seleção de bactérias com esse perfil
 175 de resistência.

176 O estudo de Cherny, Chowers e Obolski [105], que utilizou uma metodologia de
 177 redes bayesianas similar para cepas clínicas de *P. mirabilis*, encontrou padrões de associa-
 178 ções entre antimicrobianos semelhantes aos nossos. Eles observaram associações positivas
 179 entre sulfametoxazol associada à trimetoprima e fluoroquinolonas, como ciprofloxacino.
 180 Esses resultados reforçam a hipótese de que o uso de antimicrobianos em granjas pode
 181 selecionar cepas de *P. mirabilis* resistentes a outros tipos de antimicrobianos. O mesmo
 182 vínculo entre ciprofloxacino e sulfametoxazol foi identificado por Cherny *et al.* [106].

183 A conexão entre ceftiofur e o Tipo de Granja nos revelou que quando uma cepa
 184 era resistente a sulfametoxazol, a probabilidade de uma cepa de uma granja de corte ser
 185 resistente a ceftiofur (e correlacionados) era maior do que uma cepa de matriz (Tabela 5).
 186 Esses resultados são indícios de que os mecanismos de seleção e associação de resistências
 187 estão intimamente ligados ao local, manejo dos animais e esquema de tratamento. A cone-

188 xão entre ertapenem e ceftiofur (e antimicrobianos correlacionados) era esperada, (Figura
 189 3), já que ambos são β -lactâmicos, e mecanismos de resistência são compartilhados [143].
 190 [105] também observaram conexões entre cefalosporinas e penicilinas, embora nenhum
 191 trabalho tenha utilizado aztreonam e ertapenem para esse tipo de análise. É interessante
 192 notar que a resistência ao ertapenem pode ter sido fruto de mecanismos que não envolvam
 193 carbapenemases, como bombas de efluxo, permeabilidade reduzida e mudanças na parede
 194 celular [144].

195 Um achado interessante e até então não relatado na literatura foi a correlação
 196 entre o tipo de cama utilizada nos aviários e a resistência à cefoxitina. Embora seja bem
 197 documentado que camas à base de madeira, geralmente mais onerosas, estão associadas
 198 a melhores índices de desempenho das aves, não existem estudos prévios que tenham in-
 199 vestigado especificamente a influência do material da cama sobre os perfis de resistência
 200 antimicrobiana. Esta observação abre novas perspectivas para investigações sobre como
 201 práticas de manejo podem influenciar a emergência e disseminação de resistência bac-
 202 teriana em ambientes avícolas. Em linhas gerais, a rede bayesiana apresenta resultados
 203 que fazem sentido biológico, mas ela deve ser interpretada com cuidado, especialmente
 204 quanto a causalidade. Com nossos resultados, é possível apenas estabelecer correlações.
 205 Não é possível afirmar, por exemplo, que a resistência a sulfametoxazol causa a resistência
 206 a enrofloxacino, mas é razoável acreditar que o tratamento pode ser uma causa comum
 207 para esses casos.

208 Quanto ao uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, esses poderiam
 209 explicar a maior diversidade de resistência observada em bactérias de granjas de corte. No
 210 entanto, nossa análise sozinha não permite tirar conclusões definitivas sobre esse fator. A
 211 informação sobre o uso de promotores de crescimento está contida na variável referente ao
 212 tipo de granja, já que as granjas de matrizes não os utilizam, pelo menos recentemente.
 213 Entretanto, há diversos outros fatores que podem atuar como variáveis de confusão, como
 214 o tratamento terapêutico das aves, a idade delas e as diferenças nos manejos adotados nas
 215 granjas.

216 Além disso, o conhecimento sobre resistência cruzada envolvendo antimicrobianos
 217 promotores é limitado. Os utilizados nas granjas deste estudo, como virginiamicina, salino-
 218 micina, bacitracina e enramicina, atuam principalmente sobre bactérias Gram-positivas.
 219 Isso poderia alterar a microbiota intestinal das aves, favorecendo o crescimento de bac-
 220 térias Gram-negativas, e Gram-positivas resistentes, o que contribui para o aumento da
 221 resistência bacteriana [145, 146].

222 Saraiva *et al.* [147] demonstraram, em estudo *in vitro*, que concentrações subini-
 223 bitórias de promotores de crescimento, como a virginiamicina, aumentam a frequência de
 224 conjugação de *E. coli* em cama de aviário. Além disso, estudos de microbioma evidenci-
 225 aram que o uso desses antimicrobianos em frangos altera tanto o microbioma intestinal

quanto o perfil genotípico de resistência das bactérias [148]. No entanto, até o momento, nenhum estudo investigou especificamente como os promotores de crescimento impactam o perfil de resistência de *P. mirabilis*.

As resistências encontradas são preocupantes, especialmente porque muitas delas estão associadas a genes frequentemente presentes em elementos genéticos móveis. O gene *qnrD*, identificado em 2009, confere resistência a quinolonas [118], e sua presença em cepas de *P. mirabilis* tem sido registrada desde então. De acordo com Wong, Wan e Chen [17], apenas 23% dos isolados de carcaças de frango apresentaram esse gene, enquanto outros mecanismos de resistência, como mutações em *parC*, *gyrA* e *gyrB*, foram mais prevalentes. Em contraste, [12] relataram uma prevalência de 62,5% de *qnrD* em isolados de carne de frango, com números significativamente menores em fontes como carne bovina e humanos. Nossos resultados são semelhantes, e é importante destacar a discrepância entre as fontes de isolamento, já que a presença de *qnrD* foi alta tanto em granjas quanto em carne de frango, na mesma região. Apesar disso, é possível que mutações pontuais também desempenhem um papel importante, já que 11 das nossas cepas foram resistentes a alguma quinolona, mas não apresentaram o gene *qnrD*.

Assim como as quinolonas, as sulfonamidas são amplamente utilizadas no tratamento de infecções em humanos e em frangos, e genes de resistência a essas substâncias são frequentemente associados a elementos genéticos móveis. Nossos estudos indicaram que os genes *sul1* e *sul2* são provavelmente os principais responsáveis pela resistência ao sulfametoxazol. Em nosso trabalho, apenas sete cepas resistentes foram negativas para ambos os genes. Um estudo realizado por Li *et al.* [29], na China, identificou esses mesmos genes em *P. mirabilis* provenientes de amostras de granjas, encontrando uma prevalência de 94% nas cepas testadas, além de uma pequena porcentagem positiva para *sul3*. De forma similar, [12] observaram uma prevalência maior de *sul2* e menor de *sul1* em cepas de carne de frango, mas ainda grande, especialmente em cepas ESBL.

A presença de resistência fenotípica e genotípica a quinolonas e sulfonamidas era esperada, já que estes foram utilizados como tratamentos terapêuticos e metafiláticos em algumas das granjas amostradas. Entretanto, em nenhum dos questionários foi constatado o uso de β -lactâmicos, e mesmo assim, genes de resistência foram detectados. Entre os mecanismos mais comuns, os genes do grupo CTX-M são relevantes para a epidemiologia de *P. mirabilis*.

Os genes específicos de CTX-M variam ao longo do tempo e dependendo da localidade, mas esse grupo de β -lactamases apresenta uma distribuição global [149]. Em um estudo de Li *et al.* [29], foi encontrado que 52% das cepas de *P. mirabilis* isoladas de granjas eram positivas para algum dos grupos de CTX-M. No sul do Brasil, Sanches *et al.* [12], ao analisarem amostras de carne de frango, observaram que o grupo CTX-M-9 foi o mais prevalente em *P. mirabilis*, com uma proporção de aproximadamente 17%. Em

264 *E. coli* isoladas de granjas, os grupos mais comuns foram os CTX-M-2, CTX-M-1 e CTX-
 265 M-8, enquanto o grupo CTX-M-9 não foi detectado. Esses estudos também destacam a
 266 frequente associação entre a presença de genes do grupo CTX-M e outras resistências,
 267 sugerindo uma possível co-seleção.

268 Em nosso estudo, os grupos mais prevalentes foram os CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-
 269 M-1 e CTX-M-8, nesta ordem. Embora as prevalências apresentem valores semelhantes,
 270 ainda há algumas diferenças, reforçando a ideia de que a localização, a fonte e o período
 271 de isolamento podem influenciar esses parâmetros. Ainda assim, 9 cepas foram resistentes
 272 a algum β -lactâmico e não apresentaram nenhum gene destes grupos. Existem muitos
 273 outros tipos de β -lactamases que podem ser encontradas no gênero *Proteus*, como SHV,
 274 TEM e até mesmo de outros grupos de CTX-M, embora sejam menos prevalentes.

275 Nossos resultados mostraram uma baixa resistência genotípica a fosfomicina, que
 276 é um antimicrobiano de primeira escolha para o tratamento de ITUs não complicadas em
 277 mulheres adultas em vários países [150], além de ser considerado pela OMS como criti-
 278 camente importante para tratamento de infecções por Gram-negativos multirresistentes
 279 [78], portanto, esse antimicrobiano é especialmente relevante para infecções causadas por
 280 *P. mirabilis*. Mesmo assim, o uso de fosfomicina é autorizado para o uso na avicultura
 281 por vários países, inclusive pelo Brasil [151].

282 Gazal *et al.* [27], Menck-Costa *et al.* [28] e Sanches *et al.* ([12] demonstraram que
 283 a resistência a fosfomicina pode ser alta em *E. coli* e em *P. mirabilis* em contextos de
 284 avicultura, contendo principalmente o gene *fosA3*. Nossos resultados foram consideravel-
 285 mente diferentes no aspecto genotípico, já que apenas uma cepa continha o gene *fosA3*.
 286 De acordo com o CLSI, as concentrações inibitórias mínimas e *breakpoints* de tamanhos
 287 de halos para fosfomicina se aplicam exclusivamente para cepas de *E. coli* de ITUs. Isso
 288 dificulta o monitoramento e classificação de outras bactérias da ordem Enterobacterales.
 289 O teste de mutabilidade a fosfomicina, quando associado aos resultados genotípicos, nos
 290 permite uma visão mais clara dessa resistência. Como diversas cepas apresentaram núme-
 291 ros consideravelmente superiores à mediana, e à cepa referência *P. mirabilis* HI4320, que
 292 é sensível a fosfomicina [41], é plausível acreditar que mesmo sensíveis inicialmente, cepas
 293 de *P. mirabilis* podem atingir níveis de resistência clinicamente relevantes, como também
 294 demonstrado por Fonseca *et al.* [64]. Isto é especialmente relevante no contexto de criação
 295 de frangos e de ITUs.

296 Outro fator identificado em nossos resultados foi a capacidade de invasão. O es-
 297 tudo de Mathoera *et al.* [152] demonstrou *in vitro* que cepas invasivas de *P. mirabilis* têm
 298 maior capacidade de sobrevivência dentro de células epiteliais do que fora delas, especial-
 299 mente quando antimicrobianos, como a amoxicilina, estão presentes no meio de cultura.
 300 Esses achados podem ajudar a explicar a associação observada entre as variáveis "Trata-
 301 mento" e "Invasividade", sugerindo que, em um ambiente onde os antimicrobianos atuam

302 como agentes seletivos, cepas capazes de invadir células poderiam ser favorecidas para
303 sua sobrevivência. No entanto, é provável que outros fatores também estejam envolvidos,
304 uma vez que Mathoera *et al.* [152] observaram que antimicrobianos como sulfametoxazol
305 e ciprofloxacino (usados no tratamento de frangos nas granjas estudadas) continuaram a
306 ser eficazes contra cepas invasivas. De qualquer forma, a invasão é um fator de virulên-
307 cia perigoso, e vem sendo associada a persistência em certos pacientes com formações de
308 cálculos renais recorrentes [152], além de complicações em infecções renais [5].

309 A complexidade da presença e resistência antimicrobiana em *P. mirabilis* em ambi-
310 entes avícolas revela-se um fenômeno multifatorial, influenciado por variáveis como a cama
311 de maravalha, uso de antimicrobianos, presença de insetos vetores e características gené-
312 ticas das cepas. As redes bayesianas construídas demonstraram correlações interessantes
313 entre diferentes antimicrobianos, sugerindo mecanismos de co-seleção que podem ampliar
314 os perfis de resistência além dos tratamentos originalmente utilizados, já que nenhum β -
315 lactâmico foi utilizado nas aves e ainda assim resistências fenotípicas e genotípicas foram
316 detectadas. A variabilidade observada entre diferentes estudos reforça a importância de
317 considerar contextos geográficos, espécies bacterianas e práticas de manejo específicas ao
318 investigar esses padrões.

1 7 CONCLUSÃO

2 Este estudo comprovou e quantificou a prevalência de *P. mirabilis* em diferentes
3 etapas da produção aviária em granjas do norte do Paraná. Levantamos hipóteses sobre
4 os mecanismos que possibilitam a permanência dessa bactéria nos ambientes aviários, des-
5 tacando a presença do inseto *A. diaperinus* como um possível reservatório. Observamos
6 que os pintainhos não apresentaram *P. mirabilis*, enquanto aves adultas, tanto de corte
7 quanto matrizes, apresentaram a bactéria. Além disso, fatores de risco associados à pre-
8 sença de *P. mirabilis*, com ênfase na cama de palha de arroz e no uso de antimicrobianos,
9 que aumentaram em 9,61 vezes as chances de isolamento de *P. mirabilis*. Por meio de re-
10 des bayesianas e questionários, identificamos maiores níveis de resistência antimicrobiana
11 em bactérias provenientes de aves tratadas com antimicrobianos, como sulfametoxazol e
12 ciprofloxacino. Detectamos ainda correlações significativas entre resistências, como entre
13 cefalosporinas e gentamicina, além de sulfametoxazol e quinolonas, sugerindo possíveis
14 fatores de co-seleção. Fatores característicos das granjas também influenciaram a resis-
15 tência, como a cama de palha de arroz associada a uma maior resistência a cefoxitina, bem
16 como o tratamento com antimicrobianos esteve relacionado com uma maior resistência
17 a sulfametoxazol, beta-lactâmicos e quinolonas. O estudo evidenciou ainda o potencial
18 mutante de *P. mirabilis* à fosfomicina, o qual esteve presente em diversas cepas, com um
19 número consideravelmente maior de colônias por cm² quando comparadas à cepa padrão
20 *P. mirabilis* HI4320. Além disso, identificamos um perfil de virulência homogêneo, mais
21 de 80% de cepas produtoras de biofilme forte e 60% de cepas com capacidade invasiva.
22 Este trabalho contribuiu para o entendimento sobre *P. mirabilis* nas granjas e suas possí-
23 veis consequências para as aves, produtores e consumidores. Contudo, também ressaltou
24 a necessidade de monitoramento desse patógeno emergente, que ainda carece de vigilância
25 adequada.

REFERÊNCIAS

- [1] ADEOLU, M. *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016. ISSN 14665026.
- [2] 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. Publisher: Nature Publishing Group.
- [3] DRZEWIECKA, D. Significance and roles of *Proteus* spp. bacteria in natural environments. *Microbial ecology*, v. 72, p. 741–758, 2016. Publisher: Springer.
- [4] MANOS, J.; BELAS, R. The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *The Prokaryotes*, p. 245–269, 2006.
- [5] ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T.; PEARSON, M. M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. *EcoSal Plus*, v. 8, n. 1, 2018. Publisher: Am Soc Microbiol.
- [6] FLORES-MIRELES, A. L. *et al.* Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology*, v. 13, n. 5, p. 269–284, 2015. Publisher: Nature Publishing Group UK London.
- [7] FOX-MOON, S. M.; SHIRTLIFF, M. E. Urinary tract infections caused by *Proteus mirabilis*. In: *Molecular Medical Microbiology*. [S.l.]: Elsevier, 2015. p. 1389–1400.
- [8] REU, C. E. *et al.* Epidemiology of pathogens causing urinary tract infections in an urban community in southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 22, p. 505–507, 2018. Publisher: SciELO Brasil.
- [9] SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. *Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management*, p. 383–433, 2017. Publisher: Wiley Online Library.
- [10] OLIVEIRA, W. D. de *et al.* Virulence, resistance and clonality of *Proteus mirabilis* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) in Brazil. *Microbial Pathogenesis*, v. 152, p. 104642, 2021. Publisher: Elsevier.
- [11] MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 3, p. 268–281, mar. 2012. ISSN 1198-743X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14616323>>.
- [12] SANCHES, M. S. *et al.* Prevalence of Antimicrobial Resistance and Clonal Relationship in ESBL/AmpC-Producing *Proteus mirabilis* Isolated from Meat Products and Community-Acquired Urinary Tract Infection (UTI-CA) in

- Southern Brazil. *Antibiotics*, v. 12, n. 2, 2023. ISSN 2079-6382. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/12/2/370>>.
- [13] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and laboratory standards Institute*, 2021. Publisher: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [14] KANG, C.-I. *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Antibiotic Treatment of Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Infection & Chemotherapy*, v. 50, n. 1, p. 67, 2018. ISSN 2093-2340, 2092-6448. Disponível em: <<https://icjournal.org/DOIx.php?id=10.3947/ic.2018.50.1.67>>.
- [15] HIROI, M. *et al.* A Survey of β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Farm Animals and Raw Retail Meat in Shizuoka Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 64, n. 2, p. 153–155, mar. 2011. ISSN 1344-6304, 1884-2836. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/64/2/64_64.153/_article>.
- [16] SANCHES, M. S. *et al.* Genotypic and phenotypic profiles of virulence factors and antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* isolated from chicken carcasses: potential zoonotic risk. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 50, n. 3, p. 685–694, jul. 2019. ISSN 1517-8382, 1678-4405. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s42770-019-00086-2>>.
- [17] 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. Publisher: Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA.
- [18] JAKOBSEN, L. *et al.* Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 31, p. 1121–1129, 2012. ISSN 0934-9723. Publisher: Springer.
- [19] YAMAJI, R. *et al.* A population-based surveillance study of shared genotypes of *Escherichia coli* isolates from retail meat and suspected cases of urinary tract infections. *Msphere*, v. 3, n. 4, p. 10–1128, 2018. ISSN 2379-5042. Publisher: Am Soc Microbiol.
- [20] MANGES, A. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 22, n. 2, p. 122–129, 2016. ISSN 1198-743X. Publisher: Elsevier.
- [21] SANCHES, M. S. *et al.* *Proteus mirabilis* from community-acquired urinary tract infections (UTI-CA) shares genetic similarity and virulence factors with isolates from chicken, beef and pork meat. *Microbial Pathogenesis*, v. 158, n. July, 2021. ISSN 10961208.
- [22] SANCHES, M. S. *et al.* *Proteus mirabilis* causing cellulitis in broiler chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, p. 1353–1362, 2020. ISSN 1517-8382. Publisher: Springer.

- [23] PANTH, Y. Colibacillosis in poultry: A review. *Journal of Agriculture and Natural Resources*, v. 2, n. 1, p. 301–311, 2019. ISSN 2661-6289.
- [24] OLIVA, B. H. D. D. *et al.* Genomic insights into a *Proteus mirabilis* strain inducing avian cellulitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, set. 2024. ISSN 1517-8382, 1678-4405. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s42770-024-01508-6>>.
- [25] VALCESCHINI, E. Poultry meat trends and consumer attitudes. jan. 2006.
- [26] VOSS-RECH, D. *et al.* Longitudinal study reveals persistent environmental *Salmonella* Heidelberg in Brazilian broiler farms. *Veterinary Microbiology*, v. 233, p. 118–123, jun. 2019. ISSN 0378-1135. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113519301919>>.
- [27] GAZAL, L. E. d. S. *et al.* Detection of ESBL/AmpC-Producing and Fosfomycin-Resistant *Escherichia coli* From Different Sources in Poultry Production in Southern Brazil. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2021. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.604544>>.
- [28] MENCK-COSTA, M. F. *et al.* High-Frequency Detection of *fosA3* and *blaCTX-M-55* Genes in *Escherichia coli* From Longitudinal Monitoring in Broiler Chicken Farms. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 846116, 2022. ISSN 1664-302X. Publisher: Frontiers.
- [29] LI, Z. *et al.* Prevalence and characteristics of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* from broiler farms in Shandong Province, China. *Poultry Science*, v. 101, n. 4, p. 101710, abr. 2022. ISSN 0032-5791. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579122000153>>.
- [30] HAUSER, G. *Über Fäulnisbakterien und deren Beziehungen zur Septicämie: Ein Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze*. [S.l.]: FCW Vogel, 1885.
- [31] RATHER, P. N. Swarmer cell differentiation in *proteus mirabilis*. *Environmental microbiology*, Wiley Online Library, v. 7, n. 8, p. 1065–1073, 2005.
- [32] LICHTENBERGER, P.; HOOTON, T. M. Complicated urinary tract infections. *Current infectious disease reports*, Springer, v. 10, n. 6, p. 499–504, 2008.
- [33] ROCHA, S. P. D.; PELAYO, J. S.; ELIAS, W. P. Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 1–7, 2007. Publisher: Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK.
- [34] ZUNINO, P. *et al.* New aspects of the role of mr/p fimbriae in *proteus mirabilis* urinary tract infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 31, n. 2, p. 113–120, 2001.
- [35] PELLEGRINO, R. *et al.* *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (*uca*) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. *Pathogens and disease*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 67, n. 2, p. 104–107, 2013.
- [36] ZUNINO, P. *et al.* Mannose-resistant *proteus*-like and *p. mirabilis* fimbriae have specific and additive roles in *p. mirabilis* urinary tract infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 51, n. 1, p. 125–133, 2007.

- [37] SCAVONE, P. *et al.* Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *Pathogens and Disease*, v. 74, n. 5, p. ftw033, jul. 2016. ISSN 2049-632X, 2049-632X. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1093/femspd/ftw033>>.
- [38] JUAREZ, G. E.; MATEYCA, C.; GALVAN, E. M. *Proteus mirabilis* outcompetes *Klebsiella pneumoniae* in artificial urine medium through secretion of ammonia and other volatile compounds. *Heliyon*, v. 6, n. 2, fev. 2020. ISSN 2405-8440. Publisher: Elsevier. Disponível em: <[https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440\(20\)30206-1](https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440(20)30206-1)>.
- [39] BRAUN, V. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *International journal of medical microbiology*, Elsevier, v. 291, n. 2, p. 67–79, 2001.
- [40] HIMPSL, S. D. *et al.* Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. *Molecular Microbiology*, v. 78, n. 1, p. 138–157, 2010. ISSN 1365-2958. eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2958.2010.07317.x>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2010.07317.x>>.
- [41] PEARSON, M. M. *et al.* Complete Genome Sequence of Uropathogenic *Proteus mirabilis*, a Master of both Adherence and Motility. *Journal of Bacteriology*, v. 190, n. 11, p. 4027–4037, jun. 2008. Publisher: American Society for Microbiology. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jb.01981-07>>.
- [42] HU, J. *et al.* Characteristics, pathogenic mechanism, zoonotic potential, drug resistance, and prevention of avian pathogenic *Escherichia coli* (apec). *Frontiers in Microbiology*, Frontiers Media SA, v. 13, p. 1049391, 2022.
- [43] BELAS, R.; MANOS, J.; SUVANASUTHI, R. *Proteus mirabilis* zapa metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infection and immunity*, Am Soc Microbiol, v. 72, n. 9, p. 5159–5167, 2004.
- [44] ALAMURI, P.; MOBLEY, H. L. A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. *Molecular microbiology*, Wiley Online Library, v. 68, n. 4, p. 997–1017, 2008.
- [45] SWIHART, K. G.; WELCH, R. A. Cytotoxic activity of the *Proteus* hemolysin hpma. *Infection and immunity*, Am Soc Microbiol, v. 58, n. 6, p. 1861–1869, 1990.
- [46] VARDAKAS, K. Z. *et al.* Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant gram negative bacteria: the study, the patient, the bug or the drug? *Journal of Infection*, Elsevier, v. 66, n. 5, p. 401–414, 2013.
- [47] TUMBARELLO, M. *et al.* Multidrug-resistant *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and outcomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Am Soc Microbiol, v. 56, n. 6, p. 3224–3231, 2012.
- [48] COHEN-NAHUM, K. *et al.* Urinary tract infections caused by multi-drug resistant *Proteus mirabilis*: risk factors and clinical outcomes. *Infection*, Springer, v. 38, p. 41–46, 2010.

- [49] FERNANDES, R.; AMADOR, P.; PRUDÊNCIO, C. β -lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, LWW, v. 24, n. 1, p. 7–17, 2013.
- [50] LEE, J. H.; BAE, I. K.; LEE, S. H. New definitions of extended-spectrum β -lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Medicinal research reviews*, Wiley Online Library, v. 32, n. 1, p. 216–232, 2012.
- [51] COLODNER, R. Extended-spectrum β -lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *American journal of infection control*, Elsevier, v. 33, n. 2, p. 104–107, 2005.
- [52] YANG, J.-H. *et al.* Antimicrobial susceptibility and distribution of extended-spectrum β -lactamases, ampc β -lactamases and carbapenemases among proteus, providencia and morganella isolated from global hospitalised patients with intra-abdominal and urinary tract infections: results of the study for monitoring antimicrobial resistance trends (smart), 2008–2011. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, Elsevier, v. 22, p. 398–407, 2020.
- [53] PAGANI, L. *et al.* Emerging extended-spectrum β -lactamases in proteus mirabilis. *Journal of clinical microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 40, n. 4, p. 1549–1552, 2002.
- [54] BONNET, R. *et al.* Diversity of tem mutants in proteus mirabilis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Am Soc Microbiol, v. 43, n. 11, p. 2671–2677, 1999.
- [55] CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in microbiology*, v. 3, p. 110, 2012. Publisher: Frontiers Research Foundation.
- [56] LUZZARO, F. *et al.* Spread of multidrug-resistant proteus mirabilis isolates producing an ampc-type β -lactamase: epidemiology and clinical management. *International journal of antimicrobial agents*, Elsevier, v. 33, n. 4, p. 328–333, 2009.
- [57] LOMBES, A. *et al.* High prevalence of oxa-23 carbapenemase-producing proteus mirabilis among amoxicillin-clavulanate-resistant isolates in france. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Am Soc Microbiol, v. 66, n. 2, p. e01983–21, 2022.
- [58] BUSH, N. G. *et al.* Quinolones: mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules*, MDPI, v. 25, n. 23, p. 5662, 2020.
- [59] WEIGEL, L.; ANDERSON, G.; TENOVER, F. Dna gyrase and topoisomerase iv mutations associated with fluoroquinolone resistance in proteus mirabilis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Am Soc Microbiol, v. 46, n. 8, p. 2582–2587, 2002.
- [60] HARADA, K. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in proteus mirabilis isolates from dogs. *Journal of medical microbiology*, Microbiology Society, v. 63, n. 11, p. 1561–1567, 2014.
- [61] MOKRACKA, J.; GRUSZCZYŃSKA, B.; KAZNOWSKI, A. Integrons, β -lactamase and qnr genes in multidrug resistant clinical isolates of p roteus mirabilis and p. vulgaris. *Apmis*, Wiley Online Library, v. 120, n. 12, p. 950–958, 2012.

- [62] JANNAT, H. *et al.* Prevalence of qnr and aac (6')-ib-cr genes in clinical isolates of proteus spp. at a tertiary care hospital in dhaka, bangladesh. *Mymensingh Medical Journal: MMJ*, v. 31, n. 1, p. 31–36, 2022.
- [63] HE, D. *et al.* Chromosomal location of the fosa3 and blactx-m genes in proteus mirabilis and clonal spread of escherichia coli st117 carrying fosa3-positive inchi2/st3 or f2: A-: B-plasmids in a chicken farm. *International journal of antimicrobial agents*, Elsevier, v. 49, n. 4, p. 443–448, 2017.
- [64] FONSECA, M. R. B. *et al.* Increased mutability to fosfomycin resistance in *Proteus mirabilis* clinical isolates. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 58, p. 27–33, mar. 2018. ISSN 1567-1348. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134817304380>>.
- [65] WIECZOREK, P. *et al.* The aac (6') ib gene in proteus mirabilis strains resistant to aminoglycosides. *Folia histochemica et cytobiologica*, v. 46, n. 4, p. 531–533, 2008.
- [66] GIRLICH, D. *et al.* Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in Proteus spp. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, n. February, p. 1–21, 2020. ISSN 1664302X.
- [67] ABPA. *Relatório Anual ABPA 2024*. [S.l.], 2024. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2024/04/ABPA-Relatorio-Anual-2024_capa_frango.pdf>.
- [68] KRALIK, G. *et al.* Quality of Chicken Meat. In: YÜCEL, B.; TAŞKIN, T. (Ed.). *Animal Husbandry and Nutrition*. InTech, 2018. ISBN 978-1-78923-420-6 978-1-78923-421-3. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/animal-husbandry-and-nutrition/quality-of-chicken-meat>>.
- [69] BIHAN-DUVAL, E. L. *et al.* Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genetics*, v. 9, n. 1, p. 53, ago. 2008. ISSN 1471-2156. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-53>>.
- [70] PETRACCI, M.; BIANCHI, M.; CAVANI, C. Pre-slaughter handling and slaughtering factors influencing poultry product quality. *World's Poultry Science Journal*, v. 66, n. 1, p. 17–26, mar. 2010. ISSN 1743-4777, 0043-9339. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/world-s-poultry-science-journal/article/preslaughter-handling-and-slaughtering-factors-influencing-poultry-product-quality/25B81AE3996A8EBF5A66281D2D56F0F2>>.
- [71] DIARRA, S. *et al.* Alternative bedding materials for poultry: Availability, efficacy, and major constraints. *Frontiers in Veterinary Science*, Frontiers Media SA, v. 8, p. 669504, 2021.
- [72] BILGILI, S. *et al.* Influence of bedding material on footpad dermatitis in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, Elsevier, v. 18, n. 3, p. 583–589, 2009.
- [73] EMBRAPA. *Manual de manejo dos reprodutores de frango de corte*. [S.l.], 2022.
- [74] EMBRAPA. *Manual de manejo de matrizes*. [S.l.], 2022.

- [75] GOMES, A. V. S. *et al.* Overcrowding stress decreases macrophage activity and increases Salmonella Enteritidis invasion in broiler chickens. *Avian Pathology*, v. 43, n. 1, p. 82–90, jan. 2014. ISSN 0307-9457. Publisher: Taylor & Francis _eprint: <https://doi.org/10.1080/03079457.2013.874006>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03079457.2013.874006>>.
- [76] CASTANON, J. I. R. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poultry Science*, v. 86, n. 11, p. 2466–2471, nov. 2007. ISSN 0032-5791. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119390716>>.
- [77] SILVA, R. A. D. *et al.* Regulations on the Use of Antibiotics in Livestock Production in South America: A Comparative Literature Analysis. *Antibiotics*, v. 12, n. 8, p. 1303, ago. 2023. ISSN 2079-6382. Number: 8 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/12/8/1303>>.
- [78] World Health Organization. *Critically important antimicrobials for human medicine*. 6th rev. ed. Geneva: World Health Organization, 2019. ISBN 978-92-4-151552-8. Disponível em: <<https://iris.who.int/handle/10665/312266>>.
- [79] AGYARE, C. *et al.* Antibiotic Use in Poultry Production and Its Effects on Bacterial Resistance. In: KUMAR, Y. (Ed.). *Antimicrobial Resistance - A Global Threat*. IntechOpen, 2019. ISBN 978-1-78985-783-2 978-1-78985-784-9. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/antimicrobial-resistance-a-global-threat/antibiotic-use-in-poultry-production-and-its-effects-on-bacterial-resistance>>.
- [80] CANTÓN, R.; RUIZ-GARBAJOSA, P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 11, n. 5, p. 477–485, out. 2011. ISSN 1471-4892. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489211001299>>.
- [81] MAZHAR, S. H. *et al.* Co-selection of antibiotic resistance genes, and mobile genetic elements in the presence of heavy metals in poultry farm environments. *Science of The Total Environment*, v. 755, p. 142702, fev. 2021. ISSN 0048-9697. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969720362318>>.
- [82] YANG, Y. *et al.* Review of Antibiotic Resistance, Ecology, Dissemination, and Mitigation in U.S. Broiler Poultry Systems. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, nov. 2019. ISSN 1664-302X. Publisher: Frontiers. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.02639/full>>.
- [83] BROWER, C. H. *et al.* The Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Multidrug-Resistant Escherichia Coli in Poultry Chickens and Variation According to Farming Practices in Punjab, India. *Environmental Health Perspectives*, v. 125, n. 7, p. 077015, jul. 2017. Publisher: Environmental Health Perspectives. Disponível em: <<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/full/10.1289/EHP292>>.
- [84] SEO, K. W.; LEE, Y. J. Prevalence and Characterization of β -Lactamases Genes and Class 1 Integrins in Multidrug-Resistant Escherichia coli Isolates from Chicken Meat in Korea. *Microbial Drug Resistance*, v. 24, n. 10, p. 1599–1606, dez. 2018. ISSN 1076-6294. Publisher: Mary Ann Liebert, Inc., publishers. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/mdr.2018.0019>>.

- [85] 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. 574, nov. 2017. ISSN 1756-0500. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13104-017-2917-x>>.
- [86] VELOO, Y. *et al.* Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria and Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* from the Poultry Farm Environment. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 3, p. e02694–21, abr. 2022. Publisher: American Society for Microbiology. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/spectrum.02694-21>>.
- [87] ZARFEL, G. *et al.* Multiresistant Bacteria Isolated from Chicken Meat in Austria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 11, n. 12, p. 12582–12593, dez. 2014. ISSN 1660-4601. Number: 12 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/11/12/12582>>.
- [88] CUI, S.; ZHENG, J.; MENG, J. AN IMPROVED METHOD FOR RAPID ISOLATION OF *SALMONELLA* AGAINST *PROTEUS* IN CHICKEN CARCASSES. *Journal of Food Safety*, v. 26, n. 1, p. 49–61, fev. 2006. ISSN 0149-6085, 1745-4565. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4565.2005.00032.x>>.
- [89] BARBOUR, E. K. *et al.* Comparison of phenotypic and virulence genes characteristics in human and chicken isolates of *Proteus mirabilis*. *Pathogens and Global Health*, v. 106, n. 6, p. 352–357, out. 2012. ISSN 2047-7724, 2047-7732. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/2047773212Y.0000000042>>.
- [90] NAHAR, A. Multidrug Resistant-Proteus Mirabilis Isolated from Chicken Droppings in Commercial Poultry Farms: Bio-security Concern and Emerging Public Health Threat in Bangladesh. *Journal of Biosafety & Health Education*, v. 02, n. 02, 2014. ISSN 23320893. Disponível em: <<http://www.esciencecentral.org/journals/multidrug-resistantproteus-mirabilis-isolated-from-chicken-droppings-in-commercial-poultry-farms-1000120.php?aid=31563>>.
- [91] J., O. A.; ANISE, N. H.; A., O. O. Clinico-pathological study of broiler chickens experimentally infected with *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from red-headed rock agamas (*Agama agama*) co-habiting with poultry in Oyo State, Nigeria. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, v. 10, n. 1, p. 34–44, jan. 2018. ISSN 2141-2529. Disponível em: <<http://academicjournals.org/journal/JVMAH/article-abstract/6E32F8167164>>.
- [92] GYLES, C. L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal health research reviews*, Cambridge University Press, v. 9, n. 2, p. 149–158, 2008.
- [93] GREGOVA, G. *et al.* Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Instytut Medycyny Wsi, v. 19, n. 1, 2012.
- [94] BOGAARD, A. Van den *et al.* Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, Oxford University Press, v. 47, n. 6, p. 763–771, 2001.

- [95] YASSIN, A. K. *et al.* Antimicrobial resistance in clinical escherichia coli isolates from poultry and livestock, china. *PloS one*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 12, n. 9, p. e0185326, 2017.
- [96] MCHUGH, M. L. The chi-square test of independence. *Biochemia medica*, Medicinska naklada, v. 23, n. 2, p. 143–149, 2013.
- [97] BEH, E.; LOMBARDO, R. Correspondence analysis. *Theory, paractice and new strategies*, Wiley Online Library, 2014.
- [98] TEKAIA, F. Genome data exploration using correspondence analysis. *Bioinformatics and Biology insights*, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 10, p. BBI-S39614, 2016.
- [99] VOSS-RECH, D. *et al.* A temporal study of salmonella enterica serotypes from broiler farms in brazil. *Poultry Science*, Elsevier, v. 94, n. 3, p. 433–441, 2015.
- [100] HASSAN, M. M. *et al.* Knowledge, attitude, and practices on antimicrobial use and antimicrobial resistance among commercial poultry farmers in bangladesh. *Antibiotics*, MDPI, v. 10, n. 7, p. 784, 2021.
- [101] NICK, T. G.; CAMPBELL, K. M. Logistic regression. *Topics in biostatistics*, Springer, p. 273–301, 2007.
- [102] KRATZER, G. *et al.* Additive bayesian network modelling with the r package abn. *arXiv preprint arXiv:1911.09006*, 2019.
- [103] SCUTARI, M. Learning bayesian networks with the bnlearn r package. *arXiv preprint arXiv:0908.3817*, 2009.
- [104] HARTNACK, S. *et al.* Additive bayesian networks for antimicrobial resistance and potential risk factors in non-typhoidal salmonella isolates from layer hens in uganda. *BMC veterinary research*, Springer, v. 15, p. 1–9, 2019.
- [105] CHERNY, S. S.; CHOWERS, M.; OBOLSKI, U. Bayesian network modeling of patterns of antibiotic cross-resistance by bacterial sample source. *Communications Medicine*, v. 3, n. 1, p. 1–7, maio 2023. ISSN 2730-664X. Publisher: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s43856-023-00289-7>>.
- [106] CHERNY, S. S. *et al.* Revealing antibiotic cross-resistance patterns in hospitalized patients through Bayesian network modelling. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 76, n. 1, p. 239–248, jan. 2021. ISSN 0305-7453. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jac/dkaa408>>.
- [107] LUDWIG, A. *et al.* Identifying associations in escherichia coli antimicrobial resistance patterns using additive bayesian networks. *Preventive veterinary medicine*, Elsevier, v. 110, n. 1, p. 64–75, 2013.
- [108] KIM, J. I. *et al.* Machine learning for antimicrobial resistance prediction: current practice, limitations, and clinical perspective. *Clinical microbiology reviews*, Am Soc Microbiol, v. 35, n. 3, p. e00179–21, 2022.

- [109]SUNUWAR, J.; AZAD, R. K. A machine learning framework to predict antibiotic resistance traits and yet unknown genes underlying resistance to specific antibiotics in bacterial strains. *Briefings in Bioinformatics*, Oxford University Press, v. 22, n. 6, p. bbab179, 2021.
- [110]AYTAN-AKTUG, D. *et al.* Prediction of acquired antimicrobial resistance for multiple bacterial species using neural networks. *Msystems*, Am Soc Microbiol, v. 5, n. 1, p. 10–1128, 2020.
- [111]AMJAD, A. *et al.* Modified hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iranian journal of microbiology*, v. 3, n. 4, p. 189, 2011.
- [112]KWIECINSKA-PIRÓG, J. *et al.* Proteus mirabilis biofilm - Qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 4, p. 1423–1431, dez. 2014. ISSN 1517-8382. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822014000400037&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.
- [113]NATARO, J. P. *et al.* Heterogeneity of Enteroaggregative Escherichia Coli Virulence Demonstrated. *Journal of Infectious Diseases*, v. 171, n. 2, p. 465–468, fev. 1995. ISSN 0022-1899, 1537-6613. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/171.2.465>>.
- [114]ROCHA, S. P. D. *et al.* Aggregative adherence of uropathogenic Proteus mirabilis to cultured epithelial cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 319–326, 2007. Publisher: Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK.
- [115]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 & Medical Microbiology*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 29, n. 2, p. 137–143, 2000.
- [116]CESTARI, S. E. *et al.* Molecular detection of hpma and hlya hemolysin of uropathogenic proteus mirabilis. *Current microbiology*, Springer, v. 67, p. 703–707, 2013.
- [117]WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 57, n. 1, p. 154–155, 2006. Publisher: Oxford University Press.
- [118]CAVACO, L. M. *et al.* qnrD, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in Salmonella enterica Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 2, p. 603–608, fev. 2009. Publisher: American Society for Microbiology. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.00997-08>>.
- [119]PARK, C. H. *et al.* Prevalence in the united states of aac (6)-ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Am Soc Microbiol, v. 50, n. 11, p. 3953–3955, 2006.

- [120]WANRONG, Z. W. Z. *et al.* Detection of sulfonamides-resistant genes in salmonella and escherichia coli isolated from pigs and wild animals. *Veterinary Science in China*, v. 37, n. 4, p. 287–280, 2007.
- [121]SATO, N. *et al.* First detection of fosfomycin resistance gene fosa3 in ctx-m-producing escherichia coli isolates from healthy individuals in japan. *Microbial Drug Resistance*, Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, v. 19, n. 6, p. 477–482, 2013.
- [122]ZHOU, Q. *et al.* Detection of ampc β -lactamases in gram-negative bacteria. *Heliyon*, Elsevier, v. 8, n. 12, 2022.
- [123]ALAMURI, P. *et al.* Adhesion, Invasion, and Agglutination Mediated by Two Trimeric Autotransporters in the Human Uropathogen *Proteus mirabilis*. *Infection and Immunity*, v. 78, n. 11, p. 4882–4894, nov. 2010. Publisher: American Society for Microbiology. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/iai.00718-10>>.
- [124]RAMATLA, T. *et al.* Antibiotic resistance and virulence profiles of *Proteus mirabilis* isolated from broiler chickens at abattoir in South Africa. *Veterinary Medicine and Science*, v. 10, n. 2, p. e1371, 2024. ISSN 2053-1095. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/vms3.1371>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/vms3.1371>>.
- [125]ARNOLD, M. *et al.* A comparison of pooled and individual bird sampling for detection of Salmonella in commercial egg laying flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 99, n. 2-4, p. 176–184, maio 2011. ISSN 01675877. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016758771100002X>>.
- [126]MA, S. *et al.* Epidemic characteristics of the SXT/R391 integrated conjugative elements in multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolated from chicken farm. *Poultry Science*, v. 102, n. 6, p. 102640, jun. 2023. ISSN 0032-5791. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579123001645>>.
- [127]KUBASOVA, T. *et al.* Contact with adult hen affects development of caecal microbiota in newly hatched chicks. *PLOS ONE*, v. 14, n. 3, p. e0212446, mar. 2019. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0212446>>.
- [128]LOPES, M. *et al.* Quicklime treatment and stirring of different poultry litter substrates for reducing pathogenic bacteria counts. *Poultry Science*, v. 92, n. 3, p. 638–644, mar. 2013. ISSN 0032-5791. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119395641>>.
- [129]UTAMA, C. S.; SULISTIYANTO, B.; BARUS, O. pH, Total Bacteria and Total Fungi Litter Fermentation at Different Ripening Durations. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, v. 16, n. 3, p. 259–265, set. 2021. ISSN 2528-7109, 1978-3000. Disponível em: <<https://ejournal.unib.ac.id/index.php/jspi/article/view/13263>>.
- [130]WILKINSON, K. G. *et al.* Effect of heating and aging of poultry litter on the persistence of enteric bacteria. *Poultry Science*, v. 90, n. 1, p. 10–18, jan. 2011. ISSN 0032-5791. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119320565>>.

- [131]SMITH, R. *et al.* A review of the lesser mealworm beetle (*Alphitobius diaperinus*) as a reservoir for poultry bacterial pathogens and antimicrobial resistance. *World's Poultry Science Journal*, v. 78, n. 1, p. 197–214, jan. 2022. ISSN 0043-9339. Publisher: Taylor & Francis. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00439339.2022.2003172>>.
- [132]SEGABINAZI, S. D. *et al.* Bactérias da família Enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos... *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, n. 1, p. 51, jun. 2018. ISSN 1679-9216. Disponível em: <<https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/14449>>.
- [133]CRIPPEN, T. L. *et al.* The horizontal transfer of *Salmonella* between the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) and poultry manure. *Zoonoses and Public Health*, v. 65, n. 1, p. e23–e33, 2018. ISSN 1863-2378. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/zph.12404>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/zph.12404>>.
- [134]CRIPPEN, T. L. *et al.* Management Practices Affecting Lesser Mealworm Larvae (*Alphitobius diaperinus*) Associated Microbial Community in a Broiler House and After Relocating With the Litter Into Pastureland. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, jul. 2022. ISSN 1664-302X. Publisher: Frontiers. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.875930/full>>.
- [135]MUNIR, M. *et al.* Wood-based litter in poultry production: a review. *World's Poultry Science Journal*, v. 75, n. 1, p. 5–16, mar. 2019. ISSN 0043-9339, 1743-4777. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1017/S0043933918000909>>.
- [136]MILES, D.; ROWE, D.; CATHCART, T. Litter ammonia generation: Moisture content and organic versus inorganic bedding materials. *Poultry Science*, v. 90, n. 6, p. 1162–1169, jun. 2011. ISSN 00325791. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032579119419974>>.
- [137]WASFI, R. *et al.* *Proteus mirabilis* Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, ago. 2020. ISSN 2235-2988. Publisher: Frontiers. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2020.00414/full>>.
- [138]WESTHUIZEN, W. A. van der; BRAGG, R. R. Multiplex polymerase chain reaction for screening avian pathogenic *Escherichia coli* for virulence genes. *Avian Pathology*, v. 41, n. 1, p. 33–40, fev. 2012. ISSN 0307-9457. Publisher: Taylor & Francis _eprint: <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.631982>. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03079457.2011.631982>>.
- [139]KATHAYAT, D. *et al.* Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies. *Pathogens*, v. 10, n. 4, p. 467, abr. 2021. ISSN 2076-0817. Number: 4 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/10/4/467>>.
- [140]MA, W.-Q. *et al.* Contamination of *Proteus mirabilis* harbouring various clinically important antimicrobial resistance genes in retail meat and aquatic products from

- food markets in China. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 1086800, 2022. ISSN 1664-302X. Publisher: Frontiers.
- [141]KIM, S.-H.; WEI, C.-I.; AN, H. Molecular characterization of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* isolates from retail meat products. *Journal of food protection*, v. 68, n. 7, p. 1408–1413, 2005. ISSN 0362-028X. Publisher: Elsevier.
- [142]LEAL, E. d. S. Modelagem da degradação de cloro residual livre em sistemas de adubação de água de abastecimento de porte médio. 2012. Publisher: Universidade Federal de Campina Grande.
- [143]ALQURASHI, E. *et al.* Antibiotic resistance in *Proteus mirabilis*: Mechanism, status, and public health significance. *J. Pure Appl. Microbiol*, v. 16, p. 1550–1561, 2022. Disponível em: <https://www.academia.edu/download/94104505/JPAM_Vol_16_Issue3_p_1550-1561.pdf>.
- [144]AURILIO, C. *et al.* Mechanisms of action of carbapenem resistance. *Antibiotics*, MDPI, v. 11, n. 3, p. 421, 2022.
- [145]MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 4, p. 718–733, out. 2011. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3194830/>>.
- [146]PEDROSO, A. A. *et al.* Intestinal Bacterial Community and Growth Performance of Chickens Fed Diets Containing Antibiotics. *Poultry Science*, v. 85, n. 4, p. 747–752, abr. 2006. ISSN 0032-5791. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119421780>>.
- [147]SARAIVA, M. M. S. *et al.* Residual concentrations of antimicrobial growth promoters in poultry litter favour plasmid conjugation among *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 74, n. 5, p. 831–838, maio 2022. ISSN 0266-8254. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/lam.13671>>.
- [148]PAUL, S. S. *et al.* Effects of Dietary Antimicrobial Growth Promoters on Performance Parameters and Abundance and Diversity of Broiler Chicken Gut Microbiome and Selection of Antibiotic Resistance Genes. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 905050, jun. 2022. ISSN 1664-302X. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.905050/full>>.
- [149]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. Publisher: Oxford University Press.
- [150]ZHANEL, G. G.; WALKTY, A. J.; KARLOWSKY, J. A. Fosfomycin: a first-line oral therapy for acute uncomplicated cystitis. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, Wiley Online Library, v. 2016, n. 1, p. 2082693, 2016.
- [151]ROTH, N. *et al.* The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry science*, Elsevier, v. 98, n. 4, p. 1791–1804, 2019.

- [152]MATHOERA, R. B. *et al.* Pathological and therapeutic significance of cellular invasion by proteus mirabilis in an enterocystoplasty infection stone model. *Infection and immunity*, Am Soc Microbiol, v. 70, n. 12, p. 7022–7032, 2002.

ANEXO A – QUESTIONÁRIO

Questionário sobre manuseio de granja

Data:

Propriedade:

Cidade:

Endereço:

Nome do responsável:

Propriedade

Tamanho da propriedade:

Quantidade de aviários:

Número de funcionários:

Captação de água:

Propriedades vizinhas:

Elementos ao redor do aviário:

Características da produção

Tamanho do aviário:

Quantidade de matrizes por aviário:

Houve queixas de problemas com matrizes desse lote? Se sim, quais? Houve tratamento?

Tipo de cama de frango:

Idade das aves em dias:

Número de lotes alojados sobre a cama:

Houve tratamento da cama previamente ao alojamento? Se sim, qual?

Sistema de comedouros:

Sistema de bebedouros:

Sistema de ventilação:

Equipamento de manuseio:

Há histórico de doenças de outros lotes nessa cama? Se sim, quais e quais tratamentos foram utilizados?

Houve uso de antimicrobianos? Se sim, liste o princípio ativo, as datas, e se o uso foi profilático ou terapêutico.