



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WELLINGTON DANILO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS, FATORES DE VIRULÊNCIA E
CLONALIDADE DE CEPAS DE *Proteus mirabilis* ISOLADAS
DA URINA DE PACIENTES DA COMUNIDADE DE
LONDRINA - PR**

Londrina
2020

WELLINGTON DANILO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS, FATORES DE VIRULÊNCIA E
CLONALIDADE DE CEPAS DE *Proteus mirabilis* ISOLADAS
DA URINA DE PACIENTES DA COMUNIDADE DE
LONDRINA - PR**

Defesa de mestrado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Microbiologia da
Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da
Rocha

Londrina
2020

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

- O48a Oliveira, Wellington Danilo de.
Avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, fatores de virulência e clonalidade de cepas de *Proteus mirabilis* isoladas da urina de pacientes da comunidade de Londrina - PR / Wellington Danilo de Oliveira. - Londrina, 2020.
55 f. : il.
- Orientador: Sérgio Paulo Dejato da Rocha.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.
Inclui bibliografia.
1. *Proteus mirabilis* uropatogênico - Tese. 2. Infecção do trato urinário - Tese. 3. Relação clonal - Tese. 4. Resistência aos antimicrobianos - Tese. I. Rocha, Sérgio Paulo Dejato da . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

WELLINGTON DANILO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS, FATORES DE VIRULÊNCIA E
CLONALIDADE DE CEPAS DE *Proteus mirabilis* ISOLADAS
DA URINA DE PACIENTES DA COMUNIDADE DE
LONDRINA - PR**

Defesa de mestrado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Microbiologia da
Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 24 de março de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me guiado, dando sabedoria e perseverança para que este sonho pudesse ser realizado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha, por ter me recebido de braços abertos, pela paciência, ensinamentos, compreensão e elaboração deste trabalho.

Às professoras Eliana Vespero e Renata Kobayashi por aceitaram fazer parte da banca examinadora e por contribuírem com tanto ensinamento, sendo essenciais para a minha formação.

Aos meus pais, Ivanir e Aronildo, e à toda a minha família, pelo amor, suporte e apoio necessários em todos os momentos da minha vida.

Ao meu companheiro de vida, Leandro, por sempre acreditar em mim, me apoiar e me acalmar nos momentos de angústia e desânimo.

À minha colega de laboratório, Anahí, que se tornou amiga do coração e de vida, sendo essencial no meu cotidiano, me apoiando e animando os meus dias.

Ao pessoal do laboratório de Bacteriologia, Taynara, Elisa, Gustavo e Matheus pela amizade e apoio.

Às meninas do interlaboratório, Claci e Lara, pelos cafés e momentos de descontração.

Às minhas amigas, Nadja, Renata e Kawana, por sempre acreditarem em mim e verem que eu sempre posso ir além.

Ao Renan, Erick e Gazal, por cederem um pouco do seu tempo e me auxiliarem em processos e etapas essenciais para a realização deste trabalho.

Enfim, um muito obrigado a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração deste trabalho, sou eternamente grato.

OLIVEIRA, Wellington Danilo de. **Avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, fatores de virulência e clonalidade de cepas de *Proteus mirabilis* isoladas da urina de pacientes da comunidade de Londrina - PR.** 2020. Defesa (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A infecção do trato urinário (ITU) está entre as infecções que mais acometem os seres humanos, tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade. *Proteus mirabilis* é uma das principais espécies causadoras de ITUs e, normalmente, está mais relacionada às infecções consideradas complicadas. A patogenia desta espécie está relacionada com a capacidade desta em expressar seus fatores de virulência: biofilme, adesinas, urease, proteases, sideróforos e toxinas. Neste estudo investigamos a virulência, sensibilidade aos antimicrobianos e relação clonal de 183 cepas de *P. mirabilis* isoladas da urina de pacientes atendidos na comunidade de Londrina – PR. Foi constatado que 100% das cepas foram positivas para os genes de virulência *hpmA*, *ptA*, *zapA*, *mrpA*, *pmfA*, *ireA* e *atfA*; enquanto que o gene *ucaA* foi positivo em 81,42%. As cepas apresentaram altas taxas de sensibilidade aos antimicrobianos avaliados e apenas uma foi ESBL positiva. Todos os microrganismos analisados apresentaram capacidade em formar biofilme: 73,22% apresentaram intensidade muito forte de formação de biofilme, enquanto que 25,68% apresentaram forte intensidade e 1,1% intensidade moderada. Com relação à clonalidade, foram encontrados 40 complexos clonais diferentes entre os isolados testados e os nossos resultados sugerem a circulação de clones de *P. mirabilis* uropatogênico na cidade de Londrina. É de extrema importância que dados epidemiológicos regionais sejam realizados constantemente, a fim de se avaliar a patogênese, resistência e circulação de clones de *P. mirabilis* uropatogênico.

Palavras-chave: *Proteus mirabilis* uropatogênico; infecção do trato urinário; relação clonal; resistência aos antimicrobianos.

OLIVEIRA, Wellington Danilo de. **Evaluation of antimicrobial susceptibility profile, virulence factors and clonality of *Proteus mirabilis* strains isolated from the urine of patients from the Community of Londrina - PR.** 2020. Defense (Master in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Urinary tract infection (UTI) is among the infections that most affect humans, both in the hospital and in the community. *Proteus mirabilis* is one of the main species involved in UTIs and is usually more related to infections that are considered complicated. The pathogenesis of this species is related to its ability to express its virulence factors: biofilm, adhesins, urease, proteases, siderophores and toxins. In this study we investigated virulence, antimicrobial susceptibility and clonal relationship of 183 strains isolated from the urine of patients from the community of Londrina - PR. It was found that 100% of the strains were positive for the *hpmA*, *ptA*, *zapA*, *mrpA*, *pmfA*, *ireA* and *atfA* genes; whereas the *ucaA* gene was positive in 81.42%. The strains showed high susceptibility rates to the evaluated antimicrobials and only one sample was ESBL positive. All samples tested showed capacity to form biofilm: 73.22% had very strong biofilm formation intensity, while 25.68% had strong intensity and 1.1% moderate intensity. Regarding clonality, 40 different clonal complexes were found among the tested isolates and our results suggest the circulation of clones of uropathogenic *P. mirabilis* in the city of Londrina. It is of utmost importance that regional epidemiological data be carried out constantly, in order to evaluate the pathogenesis, resistance and circulation of clones of uropathogenic *P. mirabilis*.

Keywords: uropathogenic *Proteus mirabilis*; urinary tract infection; clonal relatedness; antimicrobial resistance.

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	9
2.0	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO.....	11
2.2	<i>PROTEUS MIRABILIS</i>	12
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>P. MIRABILIS</i>	14
2.3.1	Adesinas.....	14
2.3.2	Urease.....	16
2.3.3	Proteases	16
2.3.4	Sideróforos	17
2.3.5	Citotoxinas.....	17
2.3.6	Biofilme.....	18
2.4	SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	19
2.5	CLONALIDADE ENTRE ISOLADOS DE <i>P. MIRABILIS</i>	20
3.0	REFERÊNCIAS	21
4.0	OBJETIVOS	26
4.1	OBJETIVO GERAL.....	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5.0	ARTIGO CIENTÍFICO	27

1.0 INTRODUÇÃO

Normalmente, bactérias colonizam a porção distal da uretra dos seres humanos, sendo, na maioria dos casos, removidas durante a micção. Ocasionalmente, os patógenos podem ascender através da uretra, colonizar alguma porção do sistema urinário (uretra, bexiga, ureteres ou rins), se multiplicar em números significativos e causar sintomas.

As infecções do trato urinário (ITUs) estão entre as infecções bacterianas que mais afetam os seres humanos e são mais comuns em mulheres do que em homens. Esse fato se dá porque a uretra feminina é mais curta que a masculina, facilitando a entrada dos patógenos na bexiga, e, além disso, a abertura uretral é bem próxima da cavidade retal, que abriga grandes comunidades bacterianas. As enterobactérias, como *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* e *Klebsiella spp.*, são os principais patógenos envolvidos em ITUs e a espécie *Proteus mirabilis* é relacionada com infecções graves em seres humanos, sendo responsável por cerca de 20 a 45% das infecções que acometem pacientes cateterizados.

Na comunidade, as ITUs são consideradas as infecções mais comuns e normalmente são classificadas como não-complicadas. Nesse contexto, *E. coli* é a espécie mais prevalente e *Proteus spp.* está relacionada à 4,7-11,9% dessas infecções. A sensibilidade dos uropatógenos aos antimicrobianos se caracterizam como um dos princípios básicos da terapia empírica, podendo variar entre as comunidades e com o tempo. Além disso, a prevalência dos agentes etiológicos para cada faixa etária e sexo se caracterizam como fator primordial na escolha do tratamento.

Intrinsicamente, *P. mirabilis* é resistente à nitrofurantoína, polimixina e tetraciclina e geralmente são suscetíveis a penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, imipenem, ciprofloxacina e ao trimetoprim + sulfametoxazol. No entanto, altos níveis de resistência à ciprofloxacina por *P. mirabilis* vêm sendo reportados em hospitais.

A genotipagem bacteriana abriu novas oportunidades para estudos epidemiológicos e, devido a crescente relevância clínica de *P. mirabilis*, é de extrema importância que métodos eficazes de *fingerprinting* molecular sejam empregados. RAPD-PCR (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), ERIC-PCR (Consenso Intergênico Repetitivo de Enterobactérias) e REP-PCR (sequências Palindrômicas Extragênicas Repetidas) são técnicas que podem ser utilizadas para a análise da relação clonal de isolados de *P. mirabilis*. Outras técnicas como ribotipagem e PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) são eficientes para a análise da relação clonal de *P. mirabilis*, porém algumas desvantagens (como métodos trabalhosos e de alto custo) dificultam a sua utilização.

Levando em consideração que a espécie *P. mirabilis* é um patógeno capaz de causar ITUs consideradas graves, é de extrema importância que estudos acerca dos seus fatores de virulência e epidemiologia molecular sejam realizados e compreendidos. Além disso, o monitoramento da sensibilidade aos antimicrobianos faz-se necessário, a fim de se guiar a prática clínica e manejo terapêutico adequados.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção do Trato Urinário

A infecção do trato urinário (ITU) se caracteriza por uma invasão de patógenos no trato urinário e pode acometer a uretra, bexiga, ureteres ou os rins. Em atendimentos hospitalares essas infecções são as observadas com mais frequência, além de representarem cerca de 40% das infecções nosocomiais, principalmente em indivíduos em uso de cateteres urinários (FOXMAN, 2014; TORO-PEINADO et al., 2015).

As ITUs são classificadas como baixas (cistite) ou altas (pielonefrite) e como complicadas ou não complicadas. Em pacientes da comunidade, as infecções complicadas são aquelas que acometem gestantes, pessoas que apresentam alguma anormalidade estrutural ou funcional do trato urinário ou que tenham sido instrumentadas (com um cateter, por exemplo) (FOXMAN, 2010). Além disso, a presença de outra patologia em simultâneo com a infecção urinária representa um risco a mais para o paciente (TORO-PEINADO et al., 2015).

A principal via de infecção é a ascendente (os patógenos ascendem da uretra até a bexiga ou os rins), o que explica o fato de que a maioria dos casos de infecções urinárias são causadas por microrganismos presentes no trato gastrointestinal dos próprios pacientes (TORO-PEINADO et al., 2015). Em casos não-complicados, as infecções do trato urinário necessitam tratamento quando a quantidade de bactérias na urina se encontra $\geq 10^5$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro de urina (KADIGI et al., 2020).

Atualmente, estima-se que cerca de 150 milhões de pessoas são afetadas por ITUs anualmente. É mais comum em mulheres e cerca de 50-60% destas adquirem essa infecção pelo menos uma vez durante a vida. O risco de se contrair ITU aumenta com a idade, deficiências no sistema imunológico e no metabolismo e esvaziamento incompleto da bexiga devido à neuropatia autonômica (ZUBAIR et al., 2019).

Na população em geral, as infecções do trato urinário adquiridas na comunidade são as infecções bacterianas mais comuns (OZTURK; MURT, 2020).

Os patógenos *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Pseudomonas aeruginosa* são os mais frequentemente encontrados em ITUs hospitalares e comunitárias (ALGBURI et al., 2020; MOHIUDDIN; NASIRULLAH, 2019). Estudos realizados com pacientes da comunidade e em nível internacional indicam que os patógenos *E. coli* (46,4-74,2%), *Klebsiella spp.* (6,0-13,45%), *Proteus spp.* (4,7-11,9%) e *Enterococcus spp.* (5,3-9,54%) são os mais prevalentes em ITUs (COSTA et al., 2017). Enquanto que a grande maioria dos casos de ITU não complicadas são causadas por *E. coli*, as infecções complicadas (especialmente aquelas associadas ao cateterismo de longo prazo) são causadas principalmente por *P. mirabilis*, *P. stuartii*, *Morganella morganii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (KO; CHOI; SONG, 2019).

2.2 *Proteus mirabilis*

Segundo a mitologia grega, na Odisséia de Homero, Proteus possuía a habilidade de prever o futuro de qualquer um capaz de capturá-lo e foi perseguido por isso, mas mudou de forma para fugir de seus perseguidores. Na nomenclatura bacteriana, o nome *Proteus* foi utilizado pela primeira vez em 1885, por Hauser, para descrever uma bactéria que havia sido isolada de carne em putrefação e que, observado por ele, possuía a capacidade de mudar de forma (ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012).

P. mirabilis é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio-facultativo, urease-positivo, lactose-negativo, indol-negativo e pertencente à Família Enterobacteriaceae. Esta espécie, além de ser encontrada no solo e na água, faz parte da microbiota intestinal normal dos seres humanos e pode causar graves infecções (FORIS; SNOWDEN, 2017; SCHAFFER; PEARSON, 2015). Sepsis, ITU, pneumonia, meningite e infecções de feridas são exemplos de infecções que podem ser causadas por *P. mirabilis* (ALGBURI et al., 2020; WASFI et al., 2020). Além disso, casos de intoxicação alimentar causados por *P. mirabilis* têm sido relatados na China e em todo o mundo (GONG et al., 2019)

Comparado com outros membros da Família Enterobacteriaceae, *P. mirabilis* não é um patógeno encontrado com muita frequência em infecções

urinárias não complicadas. Por outro lado, em infecções urinárias consideradas graves, como as que acometem pacientes com anormalidades funcionais ou anatômicas (especialmente indivíduos com cálculo renal ou em uso de cateter urinário por um longo período de tempo), este microrganismo é isolado com frequência (CHEN et al., 2012).

P. mirabilis é considerada uma bactéria dimórfica pois pode sofrer alterações morfológicas e fisiológicas em resposta a condições ambientais e de crescimento. Esse processo é chamado de *swarming* e consiste em uma alteração onde as células curtas se diferenciam em células longas e altamente flageladas, denominadas de células swimmers (MICHELIM et al., 2008).

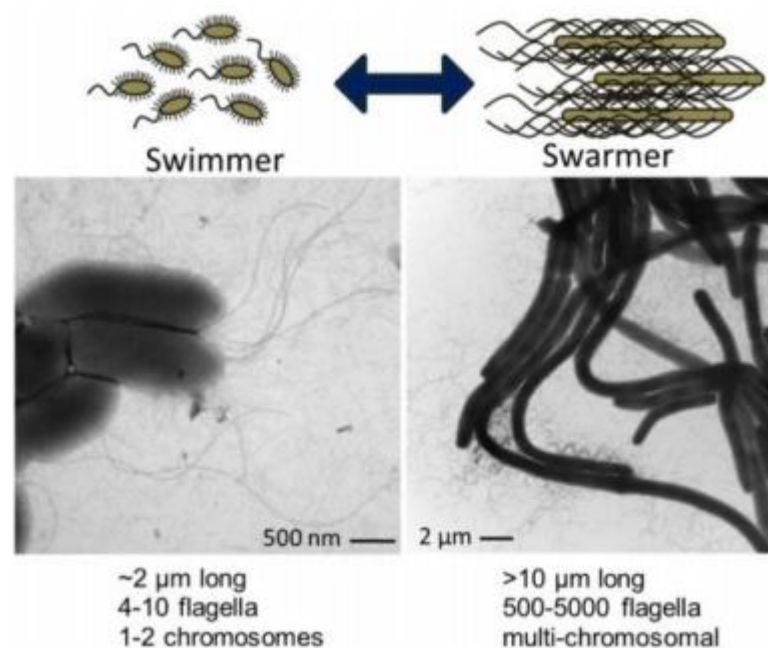


Figura 1 - *P. mirabilis* alterna entre as formas *swimming* e *swarming*. À esquerda é uma micrografia eletrônica de transmissão (MET) de células cultivadas em caldo, vegetativas exibindo flagelos peritríqueos. À direita é uma MET de células *swarm* diferenciadas, aonde os pacotes de flagelos são visíveis.

Fonte: SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M., 2015.

2.3 Fatores de virulência de *P. mirabilis*

A patogenia da espécie *P. mirabilis* está relacionada com a capacidade desta em expressar diversos fatores de virulência, como: biofilme, adesinas, urease, proteases, sideróforos e toxinas (MICHELIM et al., 2008; AHMED; HOLMSTRON, 2014).

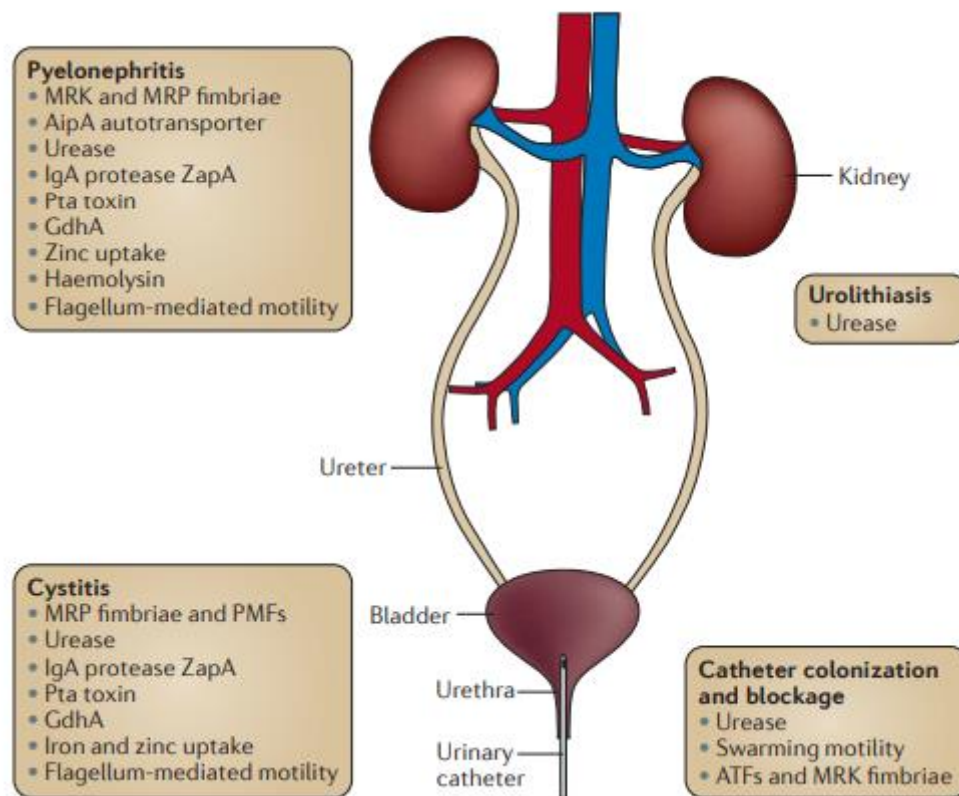


Figura 2 - Fatores de virulência de *P. mirabilis*: visão geral dos principais fatores de virulência envolvidos nos processos de cistite, pielonefrite, urolitíase e bloqueio de cateteres.

Fonte: ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T., 2012

2.3.1 Adesinas

Em infecções bacterianas é necessário que ocorra, inicialmente, a colonização do epitélio do hospedeiro por parte dos microrganismos. Essa colonização é possível através de adesinas fimbriais e não fimbriais.

As fímbrias são estruturas que variam de comprimento e diâmetro, dispostas em torno da superfície celular e que possuem proteínas adesivas em sua extremidade. Em *P. mirabilis*, essas estruturas desempenham um importante papel de ligação nas células uroepiteliais e, na literatura, são descritas as seguintes fímbrias: *mannose-resistant/Proteus-like* (MR/P), *Proteus mirabilis fimbriae* (PMF), *ambient-temperature fimbriae* (ATF) e *uroepithelial cell adhesin* (UCA) – também conhecida como *nonagglutinating fimbriae* (NAF) (ROCHA; PELAYO; ELIAS, 2007).

As fímbrias MR/P são as mais estudadas entre todas as fímbrias de *P. mirabilis* e estão fortemente relacionadas com a virulência desses patógenos. Estudos demonstram que essas fímbrias são fundamentais na infecção da bexiga e contribuem na colonização dos rins (SCHAFFER; PEARSON, 2015).

As fímbrias PMF possuem um importante papel em ITUs causadas por *P. mirabilis* e essa função foi relatada por Massad et al. (1994). Neste estudo, os resultados evidenciaram que essas fímbrias são importantes durante a colonização da bexiga, mas não desempenham nenhum papel durante a colonização do tecido renal.

As fímbrias ATF receberam esse nome pois a temperatura ótima de expressão delas é de 23°C (temperatura ambiente) (MASSAD; BAHRANI; MOBLEY, 1994). Em um estudo realizado por Zunino et al. (2000) foi sugerido que essas fímbrias estão relacionadas com a sobrevivência bacteriana externa a um hospedeiro mamífero e não exercem nenhum papel em ITUs. Porém, foi constatado por Scavone et al. (2015) que essas fímbrias desempenham uma função significativa durante a formação do biofilme.

A fímbria UCA foi isolada de uma cepa de *P. mirabilis* uropatogênica em 1986 por Wray et al. e, neste estudo, verificou-se que essas fímbrias exercem um papel fundamental na ligação dos patógenos a células uroepiteliais. Além disso, um estudo realizado por Pellegrino et al. (2013), sugeriu que elas desempenham um papel no estabelecimento e na progressão de ITU por *P. mirabilis*.

2.3.2 Urease

A enzima urease é um importante fator de virulência de *P. mirabilis* pois é capaz de hidrolisar a ureia em dióxido de carbono e amônia. Esse processo é de extrema importância para a espécie pois fornece às bactérias uma abundante fonte de nitrogênio (JUAREZ; MATEYCA; GALVAN, 2020).

A amônia liberada aumenta o pH da urina, o que gera a precipitação de íons e conseqüente formação de cristais de estruvita e apatita. Esses cristais podem se formar no interior de um cateter, bloqueando o fluxo de urina. Além disso, os cristais podem se formar na pelve ou nos túbulos renais causando inflamação, o que requer intervenção cirúrgica (ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018).

2.3.3 Proteases

As proteases são produzidas por diversas bactérias Gram-negativas e desempenham importantes papéis para o sucesso da colonização e infecção do hospedeiro. Em *P. mirabilis* a protease ZapA (ou mirabilisina) é capaz de degradar diversas proteínas defensivas do hospedeiro, incluindo IgA (CARSON et al., 2011).

Segundo Walker et al. (1999), a protease ZapA é um fator de virulência importante na manutenção e/ou estabelecimento de ITU e é expresso em células swimmers, semelhante a outros fatores de virulência de *P. mirabilis*. Esses autores evidenciam que a sobrevivência de *P. mirabilis* fica comprometida no trato urinário de camundongos infectados com a cepa deficiente de produção de ZapA, quando comparados com a cepa selvagem, indicando uma diminuição no potencial de virulência da espécie.

A inativação eficaz de ZapA pode ser uma importante estratégia anti-infecciosa/anti-virulência. Tal estratégia não é capaz de destruir o patógeno, porém exerce pressão menos seletiva do que as terapias antimicrobianas convencionais, provavelmente refletindo na diminuição da possibilidade de resistência (CARSON et al., 2011).

2.3.4 Sideróforos

O ferro (Fe) é um elemento essencial para o crescimento de quase todos os organismos vivos, pois atua em diversos processos metabólicos, incluindo a formação do biofilme bacteriano. Assim sendo, em condições de baixa disponibilidade de ferro no ambiente, os microrganismos desenvolveram estratégias de captação desse elemento, como a produção de sideróforos (AHMED; HOLMSTRON, 2014).

Os sideróforos são quelantes extracelulares que possuem alta afinidade ao ferro e formam um complexo sideróforo-ferro se ligando a ele. O complexo é absorvido para o meio intracelular através de um receptor específico na membrana externa. Em *P. mirabilis*, α -cetoácidos originados da desaminação do triptofano e fenilalanina (ácido indolpirúvico e ácido fenilpirúvico) e de outros α -cetoácidos que apresentam capacidade de quelar ferro, são utilizados como sideróforos (DRECHSEL et al., 1993; SCHAFFER; PEARSON, 2015). O gene *ireA* é um dos genes relacionados à expressão de receptores de sideróforos em *P. mirabilis* (HIMPSL et al., 2010).

2.3.5 Citotoxinas

2.3.5.1 Hemolisinas

A produção da hemolisina HpmA é considerada um importante fator de virulência de *P. mirabilis* pois essa proteína é capaz de causar a lise dos eritrócitos do hospedeiro. Dois genes são responsáveis por codificar as hemolisinas: *hpmA* (proteína HpmA) e *hpmB* (proteína HpmB). A hemolisina HpmB está relacionada com a ativação e o transporte da hemolisina HpmA, que é a responsável pelo dano celular.

Em células Vero (rim de macaco verde africano) a produção desta proteína foi relacionada com a citotoxicidade, além de contribuir com o aumento da virulência em um modelo de infecção do trato urinário em ratos (MOBLEY; CHIPPENDALE, 1990; CESTARI et al., 2013). HpmA é capaz de ocasionar a lise de

células epiteliais da bexiga humana e monócitos humanos, porém a efetividade dessa citotoxina é maior contra hemácias do que contra células nucleadas (SWIHART; WELCH, 1990).

2.3.5.2 *Proteus* toxic agglutinin (Pta)

Autotransportadores são proteínas de virulência exclusivas de bactérias Gram-negativas, que são exportadas para o exterior da célula e são frequentemente necessárias para a virulência total de bactérias patogênicas (ALAMURI; MOBLEY, 2008). Em *P. mirabilis*, o gene *ptA* codifica um autotransportador denominado *Proteus* toxic agglutinin, uma protease localizada na membrana externa e com função proteolítica (NIELUBOWICZ; SMITH; MOBLEY, 2008).

A toxina pta auxilia na capacidade de *P. mirabilis* colonizar o trato urinário, ocasionando danos nos tecidos e disseminação do patógeno para os rins, iniciando a pielonefrite aguda. A pta atua apenas em pH alcalino (como o gerado pela atividade da urease) e, no modo de ação proposto, essa citotoxina penetra na membrana da célula hospedeira, causando estresse osmótico, vazamento do citosol e despolimerização dos filamentos de actina, comprometendo a integridade estrutural da célula e resultando em danos nas células dos rins e da bexiga (KO; CHOI; SONG, 2019).

Segundo estudos, a co-infecção com o tipo selvagem *P. mirabilis*, a cepa mutante Pta foi incapaz de colonizar os rins e baço de camundongos, e apresentou pouca colonização da bexiga. (SCHAFFER; PEARSON, 2015).

2.3.6 Biofilme

O processo de formação de biofilme é de extrema importância para as bactérias pois facilita a sobrevivência desses microrganismos em condições ambientais desfavoráveis. Em um hospedeiro, a estrutura do biofilme protege os microrganismos contra as defesas imunológicas e o tratamento com antibióticos e, especialmente em pacientes imunocomprometidos, a infecção por patógenos

oportunistas formadores de biofilme pode ser extremamente grave, podendo levar o paciente à óbito (KOSTAKIOTI; HADJIFRANGISKOU; HULTGREN, 2013). Estudos demonstram que o biofilme bacteriano pode potencializar a resistência a antibióticos em até 1000 vezes (YU et al., 2018).

A importância clínica do biofilme de *P. mirabilis* ocorre em infecções do trato urinário, principalmente na superfície de cateteres. Através da formação de cristais de estruvita e apatita (pela enzima urease), o biofilme cristalino pode ocasionar a obstrução do cateter, bloqueando-o e provocando o refluxo de urina contaminada para bexiga e rins (KWIECINSKA-PIRÓG et al., 2014). Além da enzima urease, organelas de superfície, como fímbrias e adesinas, parecem desempenhar um importante papel no processo de formação do biofilme (ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018). Sendo assim, o biofilme cristalino formado por *P. mirabilis* representa um problema particular em termos de controle de infecção e tratamento, podendo ser isolado de até 40% dos pacientes instrumentados a longo prazo com incrustação e bloqueio do cateter (PELLING et al., 2019).

2.4 Sensibilidade aos antimicrobianos

O uso excessivo e não-racional de antibióticos representa um grave problema de saúde pública, pois impulsiona a seleção de bactérias resistentes (YU et al., 2018). Nos últimos anos, espécies da Família Enterobacteriaceae, incluindo *P. mirabilis*, têm demonstrado um aumento na resistência a diversos antimicrobianos, o que acabou levando a mudanças nas terapias antimicrobianas, além do aumento da taxa de mortalidade em pacientes hospitalizados.

P. mirabilis, normalmente, é suscetível a antibióticos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e ao trimetoprim + sulfametoxazol, porém possui resistência intrínseca a polimixina, nitrofurantoína e a tetraciclina (CHEN et al., 2012). A resistência de *P. mirabilis* à diversas classes de antimicrobianos, como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, vêm sendo cada vez mais reportadas e o desenvolvimento prolongado dessa resistência cria uma ameaça severa em contextos clínicos (MIRZAEI et al., 2019).

No Brasil, os antibióticos mais frequentemente prescritos no tratamento de ITUs adquiridas na comunidade em adultos são sulfametoxazol + trimetoprim, fluoroquinolonas, cefalosporinas de 1^a e 2^a gerações, amoxicilina + ácido clavulânico e nitrofurantoína (FREITAS et al., 2016). Em um estudo realizado por Wang et al. (2014) em hospitais de Taiwan e com o intuito de verificar o perfil de resistência de cepas de *P. mirabilis* isoladas entre os anos de 2002 e 2012, verificou-se que, ao longo dos anos, houve um aumento de resistência aos antibióticos cefotaxima, ceftazidima e ciprofloxacina.

2.5 Clonalidade entre isolados de *P. mirabilis*

A crescente relevância clínica de *P. mirabilis* direcionou o surgimento de métodos epidemiológicos eficazes, permitindo a identificação de isolados clínicos e ambientais, avaliação de suas relações, monitoramento de disseminação de clones e caracterização de populações bacterianas em ambientes mais ou menos restritos. A ribotipagem e o PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado) são técnicas eficientes para a caracterização clonal de *P. mirabilis*, porém são métodos trabalhosos, caros e demorados, o que limita a sua utilização (MICHELIM et al., 2008).

As sequências ERIC se caracterizam como uma família de elementos repetitivos que foram descritos pela primeira vez em *E. coli*, *S. typhimurium* e outros membros da família Enterobacteriaceae. Essas sequências podem ser utilizadas para distinguir cepas bacterianas através da técnica de ERIC-PCR, onde os iniciadores são projetados para que a amplificação ocorra entre cópias da sequência ERIC; se as posições das cópias variarem em diferentes cepas, os produtos de amplificação fornecerão a cada amostra uma impressão digital única (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; WILSON; SHARP, 2006).

Segundo Michelim et al. (2008), a técnica de ERIC-PCR possui alta capacidade discriminatória, permitindo a tipagem genética de isolados clínicos de *P. mirabilis*, sendo uma ferramenta útil para estudos epidemiológicos dessa espécie.

3.0 REFERÊNCIAS

- AHMED, E.; HOLMSTROM, S. J. M. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, p. 196-208, 2014.
- ALAMURI, P.; MOBLEY, H. L. T. A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both cytotoxin and an agglutinin. **Molecular Microbiology**, v. 68, p. 997-1017, 2008.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 743-754, 2012.
- ALGBURI, A.; ALAZZAWI, S. A.; AL-EZZY, A. I. A.; WEEKS, R.; CHISTYAKOV, V.; CHIKINDAS, M. L. Potential Probiotics *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 Co-Aggregate with Clinical Isolates of *Proteus mirabilis* and Prevent Biofilm Formation. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-13, 2020.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T.; PEARSON, M. M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus**, v. 9, p. 1, 2018.
- CARSON, L.; CATHCART, G.; SCOTT, C.; HOLLENBERG, M.; WALKER, B.; CERI, H.; GILMORE, B. Comprehensive inhibitor profiling of the *Proteus mirabilis* metalloprotease virulence factor ZapA (mirabilysin). **Biochimie**, v. 93, p. 1824-1827, 2011.
- CESTARI, S. E.; LUDOVICO, M. S.; MARTINS, F. H.; ROCHA, S. P. D.; ELIAS, W. P.; PELAYO, J. S. Molecular Detection of HpmA and HlyA Hemolysin of Uropathogenic *Proteus mirabilis*. **Current Microbiology**, v. 67, p. 703-707, 2013.
- CHEN, C.; CHEN, Y.; LU, P.; LIN, W.; CHEN, T.; LIN, C. *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: Risk factors, clinical presentation, and outcomes. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 45, p. 228-236, 2012.
- COSTA, T.; LINHARES, I.; FERREIRA, R.; NEVES, J.; ALMEIDA, A. Frequency and Antibiotic Resistance of Bacteria Implicated in Community Urinary Tract Infections in North Aveiro Between 2011 and 2014. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, p. 493-504, 2017.
- DRECHSEL, H.; THIEKEN, A.; REISSBRODT, R.; JUNG, G.; WINKELMANN, G. Alpha-keto acids are novel siderophores in the genera *Proteus*, *Providencia*, and

Morganella and are produced by amino acid deaminases. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 2727-2733, 1993.

FORIS, L.A.; SNOWDEN, J. 2017. **Proteus mirabilis Infections**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442017/#article-27889.s9>>. Acesso em: 10 de Agosto de 2019.

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nature Reviews Urology**, v. 7, p. 653-660, 2010.

FOXMAN, B. Urinary Tract Infection Syndromes. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 28, p. 1-13, 2014.

FREITAS, B. V. L.; GERMINO, R. V.; TRINO, L. M.; DIORIO, S. M.; FUSARO, A. E. Prevalência e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de uropatógenos em pacientes atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48, p. 375-380, 2016.

GONG, Z.; SHI, X.; BAI, F.; HE, X.; ZHANG, H.; LI, Y.; WAN, Y.; LIN, Y.; QIU, Y.; CHEN, Q.; HU, Q.; CAO, H. Characterization of a Novel Diarrheagenic Strain of *Proteus mirabilis* Associated With Food Poisoning in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-11, 2019.

HIMPSL, S. D.; PEARSON, M. M.; AREWANG, C. J.; NUSCA, T. D.; SHERMAN, D. H.; MOBLEY, H. L. T. Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. **Molecular Microbiology**, v. 78, p. 138-157, 2010.

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. **Helyon**, v. 6, p. 1-9, 2020.

KADIGI, D. M.; MOSHA, F.; MOYO, S.; MATEE, M. I. Etiology and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Bacterial Agents Causing Urinary Tract Infection in Children under Five years, dar es Salaam. **Journal of Biotechnology and Immunology**, v. 2, p. 1-12, 2020.

KO, Y. H.; CHOI, J. Y.; SONG, P. H. Host-Pathogen Interactions in Urinary Tract Infections. **Urogenital Tract Infection**, v. 14, p. 71-79, 2019.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the

Postantibiotic Era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 1-23, 2013.

KWIECINSKA-PIRÓG, J.; BOGIEL, T.; SKOWRON, K.; WIECKOWSKA, E.; GOSPODAREK, E. *Proteus mirabilis* biofilm - Qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1423–1431, 2014.

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

MICHELIM, L.; MULLER, G.; ZACARIA, J.; DELAMARE, A. P. L.; COSTA, S. O. P.; ECHEVERRIGARAY, S. Comparison of PCR-based molecular markers for the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 423-429, 2008.

MIRZAEI, A.; HABIBI, M.; BOUZARI, S.; KARAM, M. R. A. Characterization of Antibiotic-Susceptibility Patterns, Virulence Factor Profiles and Clonal Relatedness in *Proteus mirabilis* Isolates from Patients with Urinary Tract Infection in Iran. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3967-3979, 2019.

MOBLEY, H. L.; CHIPPENDALE, G. R. Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 161, p. 525-530, 1990.

MOHIUDDIN, A. K.; NASIRULLAH, M. UTIs among patients with Chronic Health Situations. **Journal of Medical and Clinical Studies**, v. 2, p. 121-130, 2019.

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

OZTURK, R.; MURT, A. Epidemiology of urological infections: a global burden. **World Journal of Microbiology**, p. 1-11, 2020.

PELLEGRINO, R.; SCAVONE, P.; UMPIÉRREZ, A.; MASKELL, D.; ZUNINO, P. *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 67, p. 104-107, 2013.

PELLING, H.; NZAKIZWANAYO, J.; MILO, S.; DENHAM, E. L.; MACFARLANE, W. M.; BOCK, L. J.; SUTTON, J. M.; JONES, B. V. Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters. **Letters in Applied Microbiology**, v. 68, n. 277-293, 2019.

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

SCAVONE, P.; VILLAR, S.; UMPIÉRREZ, A.; ZUNINO, P. Role of *Proteus mirabilis* MR/P fimbriae and flagella in adhesion, cytotoxicity and genotoxicity induction in T24 and Verol cells. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 73, p. 1-4, 2015.

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

SWIHART, K. G.; WELCH, R. A. Cytotoxic Activity of the *Proteus* Hemolysin HpmA. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 1861-1869, 1990.

TORO-PEINADO, I.; MEDIAVILLA-GRADOLPH, C.; TORMO-PALOP, N.; PALOP-BORRÁS, B. Diagnóstico microbiológico de las infecciones urinarias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, p. 34-39, 2015.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic acids research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

WALKER, K. E.; MOGHADDAME-JAFARI, S.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D.; BELAS, R. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 825-836, 1999.

WANG, J. T.; CHEN, P. C.; CHANG, S. C.; SHIAU, Y. R.; WANG, H. Y.; LAI, J. F.; HUANG, I. W.; TAN, M. C.; LAUDERDALE, T. L. Y.; TSAR HOSPITALS. Antimicrobial susceptibilities of *Proteus mirabilis*: a longitudinal nationwide study from the Taiwan surveillance of antimicrobial resistance (TSAR) program. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 486-495, 2014.

WASFI, R.; ABDELLATIF, G. R.; ELSHISHTAWY, H. M.; ASHOUR, H. M. First-time characterization of viable but non-culturable *Proteus mirabilis*: Induction and resuscitation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, p. 1-11, 2020.

WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, p. 1156-1168, 2006.

WRAY, S. K.; HULL, S. I.; COOK, R. G.; BARRISH, J.; HULL, R. A. Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesin from a uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. **Infection and Immunity**, v. 54, p. 43-49, 1986.

YU, S.; ZHU, X.; ZHOU, J.; CAI, Z. Biofilm inhibition and pathogenicity attenuation in bacteria by *Proteus mirabilis*. **Royal Society Open Science**, v. 5, p. 1-11, 2018.

ZUBAIR, K. U.; SHAH, A. H.; FAWWAD, A.; SABIR, R.; BUTT, A. Frequency of urinary tract infection and antibiotic sensitivity of uropathogens in patients with diabetes. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 35, p. 1664-1668, 2019.

ZUNINO, P.; GEYMONAT, L.; ALLEN, A. G.; LEGNANI-FAJARDO, C.; MASKELL, D. J. Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, p. 137-143, 2000.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar *P. mirabilis* isolados de urina de pacientes de Unidades Básicas de Saúde de Londrina – PR quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, fatores de virulência e distribuição clonal por métodos genotípicos e fenotípicos.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de sensibilidade de *P. mirabilis* aos antimicrobianos de uso clínico;
- Caracterizar genotipicamente os fatores de virulência de *P. mirabilis*;
- Caracterizar genotipicamente a resistência de *P. mirabilis* aos antimicrobianos;
- Quantificar a formação de biofilme de *P. mirabilis*;
- Avaliar a relação clonal entre os isolados de *P. mirabilis*.

5.0 ARTIGO CIENTÍFICO

Virulência, resistência aos antimicrobianos e diversidade clonal de *Proteus mirabilis* causando Infecções do Trato Urinário adquiridas na comunidade na cidade de Londrina, Estado do Paraná, Brasil

RESUMO

A infecção do trato urinário (ITU) está entre as infecções que mais acometem os seres humanos, tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade. *Proteus mirabilis* é uma das principais espécies envolvidas em ITUs e, normalmente, está mais relacionada às infecções consideradas complicadas. A patogenia desta espécie está relacionada com a capacidade desta em expressar seus fatores de virulência: biofilme, adesinas, urease, proteases, sideróforos e toxinas. Neste estudo investigamos a virulência, sensibilidade aos antimicrobianos e relação clonal de 183 cepas isoladas da urina de pacientes atendidos na comunidade de Londrina – PR. Foi constatado que 100% das cepas foram positivas para os genes *hpmA*, *ptA*, *zapA*, *mrpA*, *pmfA*, *ireA* e *atfA*; enquanto que o gene *ucaA* foi positivo em 81,42%. As cepas apresentaram altas taxas de sensibilidade aos antimicrobianos avaliados e apenas uma foi ESBL positiva. Todas as bactérias testadas apresentaram capacidade em formar biofilme: 73,22% apresentaram intensidade muito forte de formação de biofilme, enquanto que 25,68% apresentaram forte intensidade e 1,1% intensidade moderada. Com relação à clonalidade, foram encontrados 40 complexos clonais diferentes entre os microrganismos testados e os nossos resultados sugerem a circulação de clones de *P. mirabilis* uropatogênico na cidade de Londrina. É de extrema importância que dados epidemiológicos regionais sejam realizados constantemente, a fim de se avaliar a patogênese, resistência e circulação de clones de *P. mirabilis* uropatogênico.

Palavras-chave: *Proteus mirabilis* uropatogênico; infecção do trato urinário; relação clonal; resistência aos antimicrobianos.

ABSTRACT

Urinary tract infection (UTI) is among the infections that most affect humans, both in the hospital and in the community. *Proteus mirabilis* is one of the main species involved in UTIs and is usually more related to infections that are considered complicated. The pathogenesis of this species is related to its ability to express its virulence factors: biofilm, adhesins, urease, proteases, siderophores and toxins. In this study we investigated virulence, antimicrobial susceptibility and clonal relationship of 183 strains isolated from the urine of patients seen in the community of Londrina - PR. Through the PCR technique, it was found that 100% of the strains were positive for the *hpmA*, *ptA*, *zapA*, *mrpA*, *pmfA*, *ireA* and *atfA* genes; whereas the *ucaA* gene was positive in 81.42%. The strains showed high susceptibility rates to the evaluated antimicrobials and only one sample was ESBL positive. All samples tested showed capacity to form biofilm: 73.22% had very strong biofilm formation intensity, while 25.68% had strong intensity and 1.1% moderate intensity. Regarding clonality, 40 different clonal complexes were found among the tested isolates and our results suggest the circulation of clones of uropathogenic *P. mirabilis* in the city of Londrina. It is of utmost importance that regional epidemiological data be carried out constantly, in order to evaluate the pathogenesis, resistance and circulation of clones of uropathogenic *P. mirabilis*.

Keywords: uropathogenic *Proteus mirabilis*; urinary tract infection; clonal relatedness; antimicrobial resistance.

INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) são uma das infecções que mais acometem os seres humanos, tanto no ambiente hospitalar quanto adquiridas na comunidade (TUMTURK et al., 2019). Essas infecções podem afetar qualquer parte do sistema urinário (incluindo os rins, ureteres, bexiga e uretra) e estima-se que, anualmente, cerca de 150 milhões de pessoas são afetadas por ITUs no mundo todo (DURGADEVI et al., 2019; ZUBAIR et al., 2019).

Clinicamente, as ITUs podem ser classificadas em complicadas e não complicadas. As infecções não complicadas ocorrem em indivíduos relativamente saudáveis, enquanto que as ITUs complicadas acometem pacientes

que apresentam anormalidades estruturais e/ou funcionais do trato urinário, pacientes imunocomprometidos, pacientes que foram submetidos a um cateter urinário ou pacientes que sofrem de outras doenças (KO; CHOI; SONG, 2019).

Proteus mirabilis é um dos principais agentes causais de ITUs consideradas complicadas nos seres humanos (NGUYEN et al., 2019). Essa espécie se caracteriza como um microrganismo comensal, que habita o trato gastrointestinal de seres humanos e outros animais, e que pode causar infecções em feridas e do trato respiratório, além de ITU (JUAREZ; MATEYCA; GALVAN, 2020; NGUYEN et al., 2019). *P. mirabilis* expressa diversos fatores de virulência envolvidos na fisiopatologia da ITU, incluindo a formação de biofilme, produção de enzimas (urease, ZapA) e citotoxinas, motilidade via flagelos peritriquíos e sistemas de aquisição de ferro (ALGBURI et al., 2020).

Normalmente, *P. mirabilis* é suscetível a antibióticos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e ao trimetoprim/sulfametoxazol, porém possui resistência intrínseca a polimixina, nitrofurantoína e a tetraciclina (CHEN et al., 2012). A prescrição empírica de antimicrobianos em ITUs adquiridas na comunidade é uma prática comum; no entanto, a resistência bacteriana aos antimicrobianos vem aumentando globalmente, o que representa uma diminuição na efetividade do tratamento empírico (RODRÍGUEZ et al., 2019). Além disso, o surgimento de cepas multirresistentes que causam ITUs tem sido cada vez mais reportadas, tanto no ambiente hospitalar quanto no comunitário (ZUBAIR ET AL., 2019).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os marcadores de virulência, padrões de resistência e distribuição clonal de *P. mirabilis* isolados de urina de pacientes atendidos com ITU em Unidades Básicas de Saúde (UBS) no município de Londrina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento

Foram estudados 183 isolados de *P. mirabilis*. Estes microrganismos foram isolados de culturas de urina de pacientes com ITU, atendidos em Unidades

Básicas de Saúde (UBS) de Londrina – PR. As coletas foram realizadas no período de dezembro de 2016 a julho de 2017 e as amostras foram identificadas pelo sistema Vitek® 2 COMPACT system (bioMérieux, Marcy L’Etoile, France). Somente as amostras de urina com $\geq 10^5$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram selecionadas para o estudo. Os isolados foram denominados de LBUEL–H143 até LBUEL–H325. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), parecer 1.590.120.

Determinação Fenotípica e Genotípica da resistência aos antimicrobianos

O perfil de resistência aos antimicrobianos dos 183 isolados de *P. mirabilis* foi determinado pelo sistema automatizado Vitek® 2 COMPACT system (bioMérieux, Marcy L’Etoile, France) e seguindo a interpretação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2018). Foram testados os seguintes antimicrobianos: Ácido nalidíxico, Amicacina, Amoxicilina + Ácido clavulânico, Ampicilina, Cefalotina, Cefepima, Ceftriaxona, Cefuroxima, Ciprofloxacina, Ertapenem, Gentamicina, Meropenem, Nitrofurantoína, Norfloxacina, Piperacilina + Tazobactam e Trimetoprim + Sulfametoxazol.

Os isolados resistentes as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração foram submetidos ao teste de sinergismo de duplo disco a fim de se avaliar a produção fenotípica de ESBL (betalactamases de espectro estendido), utilizando-se os antimicrobianos recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2018) e, através da PCR, foram avaliados os genes de ESBL das famílias CTX-M (1, 2, 8, 9 e 25) (WOODFORD; FAGAN; ELLINGTON, 2006) e AmpC (MOX, FOX, EBC, AAC, DHA, CIT e CMY-2) (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002). Além disso, os isolados que apresentaram fenótipo de resistência à outras classes de antimicrobianos foram submetidos à PCR para pesquisa dos seguintes genes de resistência: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* (CATTOIR et al., 2007), *qnrD* (CAVACO et al., 2009) - quinolonas; *aac(6’)-Ib-cr* (CHEN et al., 2012) – quinolonas/aminoglicosídeos; *sul1*, *sul2* (LI et al., 2007) – sulfonamidas.

Obtenção do DNA bacteriano

O DNA bacteriano foi obtido através do método de extração por fervura seguido de choque térmico. Desta forma, 1500 µL do cultivo em caldo Luria Bertani (LB) foi transferido para um microtubo novo e esterilizado de 1,5 mL e centrifugado a 5.600 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso com 300 µL de água ultrapura estéril e conduzido à fervura a 100°C por 10 minutos para liberação e desnaturação do DNA bacteriano. Após a fervura, o material foi transferido imediatamente para o banho de gelo (0°C) por 5 minutos. Posteriormente, a amostra passou por outra centrifugação a 5.600 x g por 5 minutos, transferindo-se o sobrenadante, denominado de lisado bacteriano (contendo o DNA), para outro microtubo, o qual foi utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Determinação dos Fatores de Virulência

Com o intuito de constatar a presença dos genes de virulência característicos de *P. mirabilis*, a PCR foi realizada em um termociclador contendo o volume final de 25 µL, este que foi composto de 1,0 µL de MgCl₂ - 2 mM - (Invitrogen®), 2,5 µL de tampão 10X (Invitrogen®), 2,5 µL de dNTPs - 0.2 mM (Invitrogen®), 0,5 µL do Primer Forward - 20 pmol e 0,5 µL do Primer Reverse - 20 pmol (Invitrogen®), 0,5 µL de Taq DNA polimerase – 1.5 U/µL (Invitrogen®), 2,0 µL do lisado bacteriano e 15,5 µL de água ultrapura. Os genes de virulência que foram pesquisados são mostrados abaixo na tabela 1.

Tabela 1 – Fatores de virulência que foram pesquisados associados à virulência de *P. mirabilis*.

Gene	Sequência do oligonucleotídeo iniciador (5' → 3')	Fator de virulência	Temperatura	Referência
<i>hpmA</i>	(F) GTTGAGGGGCGTTATCAAGAGTC (R) GATACTGTTTTGCCCTTTTGTGC	citotoxina	55°C	Cestari et al. (2013)
<i>ptA</i>	(F) CCACTGCGATTATCCGCTCT (R) ATCGGCAGAAGTGACAAGCA	citotoxina	60°C	Sanches et al. (2019)
<i>zapA</i>	(F) TATCGTCTCCTTCGCCTCCA (R) TGGCGCAAATACGACTACCA	protease	59°C	Sanches et al. (2019)
<i>mrpA</i>	(F) GAGCCATTCAATTAGGAATAATCCA (R) AGCTCTGTA CTTCTTGTACAGA	fímbria	58°C	Rocha et al. (2007)
<i>pmfA</i>	(F) CAAATTAATCTAGAACCACTC (R) ATTATAGAGGATCCCTTGAAGGTA	fímbria	54°C	Zunino et al. (2003)
<i>ucaA</i>	(F) GCTTTTACATCCCCAGCGGT (R) GCTGCATTTGCTGGCTCATC	fímbria	60°C	Sanches et al. (2019)
<i>ireA</i>	(F) ACTACGATAACGAGCGCCAG (R) GCCCTAACTGGGGGAATACG	receptor de sideróforos	60°C	Sanches et al. (2019)
<i>atfA</i>	(F) CATAATTTCTAGACCTGCCCTAGCA (R) CTGCTTGGATCCGTAATTTTAAACG	fímbria	50°C	Zunino et al. (2000)

F: senso, R: anti-senso.

Eletoforese em gel de agarose

Após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1% a 2%, de acordo com o tamanho do fragmento a ser amplificado, corado com SYBR SAFE (Invitrogen®) e emergido em tampão Tris Borato EDTA (TBE) (89mM Tris base; 89mM Ácido Bórico; 2mM EDTA; pH 8,3). O marcador molecular escolhido foi o de 1Kb Ladder (Invitrogen®). O sistema foi submetido a uma diferença de potencial (70V) com amperagem constante por 50 minutos. Após o tempo estimado, o gel foi observado em um transluminador com luz ultravioleta.

Biofilme

O biofilme foi realizado em placas de poliestireno contendo 96 poços de acordo com Kwiecinska-Piróg et al. (2014), com modificações. A cepa *E. coli* EAEC-042, considerada uma forte formadora de biofilme (NATARO et al., 1995), foi utilizada como controle positivo e o caldo TSB (Tryptic Soy Broth) esterilizado como controle negativo.

Os isolados de *P. mirabilis* foram cultivados em caldo TSB por 18h a 37°C. Em seguida, 1,0 mL do cultivo foi centrifugado durante 5 minutos a 8.904 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi lavado com 1,0 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e centrifugado novamente a 8.904 x g por 5 minutos. O precipitado foi utilizado para ajustar a suspensão da turbidez na escala de 0,5 MacFarland em TSB esterilizado. Posteriormente, 20 µL de cada suspensão foram colocados nos poços, em quintuplicata, e esses foram completados com 180 µL de TSB esterilizado, totalizando um volume final de 200 µL. Posteriormente, as placas foram incubadas na estufa a 37°C durante 24 horas. Após o período de incubação, as soluções foram removidas e os poços lavados com 150 µL água destilada esterilizada. Após a lavagem, a água destilada foi removida e os poços foram preenchidos com 200 µL de metanol absoluto por 10 minutos em temperatura ambiente. O metanol foi removido e as placas foram secas em estufa a 37°C por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 200 µL de cristal violeta (CV) a 0,1% (m/v) em cada poço por 10 minutos em temperatura ambiente. O CV foi removido e os poços lavados com água destilada esterilizada. Posteriormente, a água foi removida e as placas ficaram secando por 5 minutos a 37°C. Finalmente, foi adicionado 200 µL de metanol absoluto em cada poço por 10 minutos antes da leitura.

As leituras de absorvância (A) foram realizadas com um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Para avaliar a formação de biofilme para cada cepa e controle negativo, a média aritmética da absorvância e o desvio padrão foram utilizados. O valor limiar da absorvância (T) foi a prova da formação do biofilme e foi definido como a soma da média aritmética do controle negativo e um valor triplo de seu desvio padrão ($T = x_{nc} + 3\delta$).

Tabela 2 - Critério de intensidade de formação de biofilme de *P. mirabilis* com respectivo valor de absorvância (A) mensurado.

Valor da absorvância	Intensidade do biofilme
$A \leq T$	Ausente
$T < A \leq 2T$	Fraco
$2T < A \leq 4T$	Moderado
$4T < A \leq 8T$	Forte
$A \geq 8T$	Muito forte

Legenda: A: valor da média aritmética das amostras; T: valor limiar da absorvância do controle negativo.

Análise do perfil de similaridade genética

O perfil de similaridade genética entre as cepas foi determinado através da técnica de ERIC-PCR (Consenso Intergênico Repetitivo de Enterobactérias). Foram utilizados os seguintes *primers*: ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), de acordo com Michelim et al. (2008). Cada reação foi realizada contendo um volume final de 25 μ L, composto de 1,0 μ L de $MgCl_2$ - 2 mM - (Invitrogen®), 2,5 μ L de tampão 10X (Invitrogen®), 2,5 μ L de dNTPs - 0.2 mM (Invitrogen®), 0,5 μ L do Primer Forward - 20 pmol e 0,5 μ L do Primer Reverse - 20 pmol (Invitrogen®), 0,5 μ L de Taq DNA polimerase - 1.5 U/ μ L (Invitrogen®), 2,0 μ L do lisado bacteriano e 15,5 μ L de água ultrapura. Para a amplificação do DNA, cada amostra foi submetida à uma etapa inicial de desnaturação por 4 minutos a 92°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 1 minuto a 48°C, extensão por 5 minutos a 72°C e extensão final a 72°C por 5 minutos. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5% e coradas com brometo de etídio. Todas as amostras foram realizadas em triplicata para confirmar a reprodutibilidade dos perfis de bandas obtidos. Um dendrograma de similaridade foi construído usando o BioNumerics v.5.1 (Applied Maths, Keijkstraat, Bélgica) pelo método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) usando o coeficiente de similaridade de Dice para a análise dos clusters. Apenas as bandas entre 200 bp e 3000 bp foram incluídas nas análises. O corte para definição dos clusters ficou em 85%, visto que este é o corte padrão para bactérias Gram-negativas em um estudo com finalidade epidemiológica (HUNG et al., 2014).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do software estatístico R versão 3.6.3, com intervalo de confiança (IC) em 95% e os resultados foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Coleção de isolados e Identificação

Um total de 183 cepas de *P. mirabilis* uropatogênicos foram avaliados neste estudo. Destes, 146 foram isolados de pessoas do sexo feminino (79,78%) e 37 (20,22%) do sexo masculino. A idade dos pacientes variou entre 1 e 95 anos. Sendo que, 46 cepas (25,14%) foram obtidas de pacientes entre 0-12 anos; 15 (8,20%) de pacientes entre 13-18 anos; 75 (40,98%) de pacientes entre 19-59 anos e 47 (25,68%) de pacientes entre 60-95 anos. Das 146 pacientes do sexo feminino, 34 (18,58%) eram gestantes. Todas as cepas foram coletadas em 44 UBS diferentes; a UBS22 foi a mais prevalente, com 13 cepas. Nas UBS 02, 15, 23, 25, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 e 44 foram isoladas apenas uma cepa cada.

Em mulheres, a atividade sexual frequente se caracteriza como um fator de risco para adquirir ITU (MANZLOOR et al., 2020) e, no nosso estudo, as análises estatísticas evidenciaram que infecções por *P. mirabilis* tem 182,58 vezes mais chances de ocorrer em mulheres na faixa etária de 16 a 31 anos ($p < 0,001$ /IC: 0-infinito); e 122,6 vezes mais chances em mulheres na faixa etária de 32 a 47 anos ($p: 0,006$ /IC: 0-infinito). Já nos homens, estatisticamente, as infecções por *P. mirabilis* tem 5,15 vezes mais chances de ocorrer na faixa etária de 48 a 62 anos ($p: 0,009$ /IC: 1.44-18.45).

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, foram encontrados os seguintes resultados: 94,5% sensível ao Ácido nalidíxico, 99,5% sensível a Amicacina, 99,5% sensível a Amoxicilina + Ácido clavulânico, 80,3% sensível a Ampicilina, 97,8% sensível a Cefalotina, 98,4% sensível a Cefepima, 98,4% sensível a Ceftriaxona, 98,4% sensível a Cefuroxima, 96,7% sensível a Ciprofloxacina, 100% sensível a Ertapenem, 94,5% sensível a Gentamicina, 100% sensível a Meropenem, 0% sensível a Nitrofurantoína, 96,7% sensível a Norfloxacin, 100% sensível a Piperacilina + Tazobactam, 78,1% sensível a Trimetoprim + Sulfatomexazol. O Trimetoprim + Sulfatomexazol foi o antibiótico que apresentou a maior taxa de resistência, seguido da Ampicilina. Estatisticamente, no nosso estudo, a resistência ao Trimetoprim + Sulfametoazol não foi um fator importante entre as faixas etárias e os gêneros dos pacientes ($p > 0,05$).

De acordo com a tabela 3, 15 padrões de resistência diferentes foram encontrados entre os isolados testados. Do total de microrganismos estudados, 135 (73,8%) não apresentaram resistência aos antibióticos testados, enquanto que 15 (8,1%) apresentaram resistência à uma classe de antibióticos; 20 (10,9%) à duas classes de antibióticos e 13 (7,1%) apresentaram o fenótipo de multirresistência (resistentes a pelo menos três classes de antibióticos diferentes). Apenas o isolado LBUEL–H301 foi positivo para o fenótipo de produção de ESBL.

Tabela 3 – Diferentes padrões de resistência aos antimicrobianos encontrados entre os isolados

Padrão de resistência (P.R.)	Antimicrobianos	Quantidade cepas
P.R. 01	Sensível a todos	135
P.R. 02	NAL	1
P.R. 03	AMP	4
P.R. 04	SXT	10
P.R. 05	AMP, GEN	2
P.R. 06	AMP, SXT	18
P.R. 07	AMP, GEN, SXT	2
P.R. 08	AMP, SXT, NAL	2
P.R. 09	AMC, AMP, CEP, GEN	1
P.R. 10	CIP, GEN, NOR, SXT, NAL	1
P.R. 11	AMP, CIP, NOR, SXT, NAL	2
P.R. 12	AMP, CIP, GEN, NOR, SXT, NAL	2
P.R. 13	AMP, CEP, FEP, CRO, CXM, GEN, SXT, NAL	1
P.R. 14	AMK, AMP, CEP, FEP, CRO, CXM, GEN, SXT	1
P.R. 15	AMP, CEP, FEP, CRO, CXM, CIP, NOR, SXT, NAL	1

Abreviações: AMC: Amoxicilina + Ácido clavulânico; AMK: Amicacina; AMP: Ampicilina; CEP: Cefalotina; CIP: Ciprofloxacina; CRO: Ceftriaxona; CXM: Cefuroxima; FEP: Cefepima; GEN: Gentamicina; NAL: Ácido nalidíxico; NOR: Norfloxacin; SXT: Trimetoprim + Sulfametoxazol.

Determinação genotípica de genes de resistência

As cepas que apresentaram o fenótipo de resistência a pelo menos um antimicrobiano da classe das quinolonas, sulfonamidas e/ou aminoglicosídeos, foram submetidas à PCR para avaliação da presença de alguns genes de resistência. Os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, e *aac(6')-Ib-cr* não foram encontrados nos microrganismos testados. Das 40 cepas resistentes ao Trimetoprim + Sulfametoxazol, 7 (17,5%) foram positivas para o gene *sul1* e 20 (50%) foram positivas para o gene *sul2*; 4 (10%) cepas apresentaram os dois genes.

Os genes das famílias AmpC (MOX, FOX, EBC, AAC, DHA, CIT e CMY-2) e CTX-M (1, 2, 8 e 25) não foram encontrados em nenhuma das cepas que apresentaram o fenótipo de resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração; enquanto que o gene CTX-M-9 foi positivo para a cepa LBUDEL-H301 (única cepa positiva para o fenótipo de ESBL).

Caracterização genotípica de Fatores de Virulência

A caracterização genotípica foi realizada através da PCR. Foi investigada a presença dos seguintes genes de virulência: *hpmA*, *ptA*, *zapA*, *mrpA*, *pmfA*, *ucaA*, *ireA* e *atfA*. Do total de cepas estudadas, 149 (81,42%) foram positivas para todos os genes pesquisados, enquanto que 34 (18,58%) apresentaram todos os genes, com exceção do gene *ucaA*. Não houve diferença significativa entre a presença do gene *ucaA* e a resistência aos antimicrobianos avaliados ($p>0,05$).

Teste de formação de Biofilme

Neste estudo, todas as cepas testadas apresentaram capacidade em formar biofilme. Do total de 183 cepas, 134 (73,22%) apresentaram capacidade muito forte de formação de biofilme; 47 (25,68%) apresentaram capacidade forte e 2 (1,1%) capacidade moderada em formar biofilme. As cepas produtoras de biofilme moderado foram isoladas de pacientes apenas do sexo feminino e dos grupos de idade 0-12 anos e 19-59 anos. As cepas produtoras de biofilme com capacidade de formação forte e muito forte foram isoladas de ambos os sexos e de todos os grupos de idade.

A prevalência da resistência à Ampicilina foi maior nas cepas que apresentaram intensidade forte (27,1%) do que as que apresentaram intensidade muito forte (17,2%). O mesmo foi observado com outros antimicrobianos: Ciprofloxacina (8,5% intensidade forte e 1,5% intensidade muito forte); Gentamicina (10,6% intensidade forte e 3,7% intensidade muito forte); Norfloxacin (8,5% intensidade forte e 1,5% intensidade muito forte); Trimetoprim + Sulfatomexazol (25,5% intensidade forte e 20,9% intensidade muito forte); Ácido nalidíxico (12,8% intensidade forte e 2,2% intensidade muito forte). Não houve diferença significativa entre a intensidade de formação de biofilme e a idade e gênero dos pacientes ($p>0,05$).

Diversidade Clonal

De acordo com o dendrograma gerado a partir de dados do ERIC-PCR (Figura Suplementar 1), foram encontrados quarenta complexos clonais (CC) diferentes (tabela 5) entre os 183 *P. mirabilis* testados. O número de cepas pertencentes a cada complexo, variou entre 2 e 18. Foram encontrados 31 clones com 100% de similaridade entre eles (tabela 4). Destes, 3 eram o mesmo clone (figura 1). Nos complexos clonais 8 e 24 foram encontrados dois clones distintos, enquanto que no complexo clonal 12 foram encontrados três. Nos complexos clonais 6, 11, 18, 27, 36, 37 e 38 foram encontrados um clone cada.

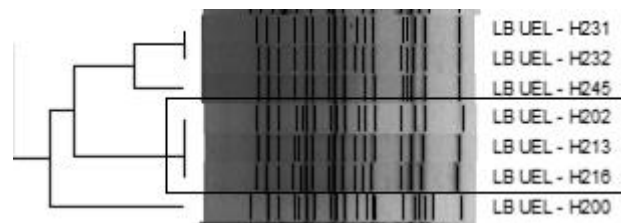


Figura 1 - As cepas LBUEL-H202, LBUEL-H213 e LBUEL-H216, pertencentes ao complexo clonal 08, apresentaram 100% de similaridade.

De acordo com a Tabela 4, alguns clones encontrados diferem com relação às suas características de intensidade de formação de biofilme, dos fatores de virulência e da resistência aos antimicrobianos; enquanto que outros apresentam características idênticas. Curiosamente, os clones LBUEL-H204/LBUEL-H219 e LBUEL-H192/LBUEL-H244, pertencentes ao complexo clonal 24, foram isolados das UBS 22 e 13, destacando a ideia de que existem clones com 100% de similaridade circulantes entre as UBSs.

Tabela 4 – Características encontradas nos clones

Clone	Complexo Clonal (CC)	Cepas	UBS	Características de biofilme, virulência e resistência
Clone 1	CC6	LBUEL-H264 e LBUEL-H282	40 e 08	F/MF; VT; MDR neg.
Clone 2	CC8	LBUEL-H231 e LBUEL-H232	11 e 04	MF; VT; MDR neg.
Clone 3	CC8	LBUEL-H202, LBUEL-H213 e LBUEL-H216	06, 26 e 18	MF; VT; MDR neg.
Clone 4	CC11	LBUEL-H260 e LBUEL-H261	03 e 11	MF; VT; MDR neg.
Clone 5	CC12	LBUEL-H275 e LBUEL-H279	01 e 22	F/MF; VT; MDR neg.
Clone 6	CC12	LBUEL-H211 e LBUEL-H276	28 e 22	F/MF; VT; MDR neg.
Clone 7	CC12	LBUEL-H274 e LBUEL-H281	26 e 14	F; VT; MDR neg.
Clone 8	CC18	LBUEL-H169 e LBUEL-H210	11 e 06	MF; VT; MDR neg.
Clone 9	CC24	LBUEL-H204 e LBUEL-H219	22 e 13	F/MF; VT; MDR neg.
Clone 10	CC24	LBUEL-H192 e LBUEL-H244	22 e 13	MF; VT; MDR neg.
Clone 11	CC25	LBUEL-H203 e LBUEL-H221	22 e 07	F/MF; VT; MDR neg.
Clone 12	CC27	LBUEL-H151 e LBUEL-H152	08 e 09	MF; <i>ucaA</i> neg.; MDR neg. e MDR pos.
Clone 13	CC36	LBUEL-H234 e LBUEL-H237	16 e 33	MF; VT; MDR neg.
Clone 14	CC37	LBUEL-H162 e LBUEL-H163	17 e 03	MF; VT; MDR neg.
Clone 15	CC38	LBUEL-H156 e LBUEL-H158	13 e 06	F/MF; VT; MDR neg.

Legenda: F: intensidade forte de formação de biofilme; MF: intensidade muito forte de formação de biofilme; VT: Virulência Total (cepas que apresentaram todos os genes de virulência); *ucaA* neg: cepas que apresentaram todos os genes, exceto o gene *ucaA*; MDR pos.: resistência a mais de três classes de antimicrobianos; MDR neg.: resistência a menos de três classes de antimicrobianos.

De todos os complexos encontrados, seis complexos (CC8, CC11, CC12, CC24, CC34 e CC37) agruparam, no mínimo, seis cepas. Os complexos clonais 1, 6, 11, 12, 19, 24 e 38 agruparam mais de uma cepa que foi isolada da mesma UBS. No CC1, as cepas LBUEL-H309 e LBUEL-H316 foram isoladas da UBS26; no CC6, as cepas LBUEL-H282 e LBUEL-H315 foram isoladas da UBS08; no CC11, as cepas LBUEL-H251 e LBUEL-H260 foram isoladas da UBS03; no CC12 as cepas LBUEL-H278, LBUEL-H280 e LBUEL-H281 foram isoladas da UBS14, enquanto que as cepas LBUEL-H276 e LBUEL-H279 foram isoladas da UBS22. No CC19, as cepas LBUEL-H168 e LBUEL-H188 foram isolados da UBS13; no CC24 as cepas LBUEL-H206, LBUEL-H219 e LBUEL-H244 foram isoladas da UBS13, enquanto que as cepas LBUEL-H177, LBUEL-H183, LBUEL-H192 e LBUEL-H204 foram isoladas da UBS22; no CC38, as cepas LBUEL-H156 e LBUEL-H165 foram isolados da UBS13. Conforme observado, as UBS 13 e 22 foram as únicas relacionadas com o aparecimento de cepas agrupadas em mais de um complexo clonal.

O CC19 abriga as cepas LBUEL-H168 e LBUEL-H188 que foram isoladas do mesmo paciente (um menino de 1 ano de idade) com um provável caso de ITU recorrente. As duas infecções ocorreram nos meses de fevereiro e março de 2017. A outra cepa isolada do mesmo paciente (LBUEL-H219) encontra-se no CC24

e é um clone de uma cepa isolada de outro paciente (LBUEL–H204), a infecção ocorreu no mês de abril de 2017.

Tabela 5 – Diferentes características encontradas nos complexos clonais

CC (Complexo Clonal)	Intensidade de biofilme	Genes de virulência	Antibiograma	Gene de resistência
CC1	F/MF	VT	MDR neg.	
CC2	F/MF	VT/ <i>ucaA</i> neg.	MDR neg.	Sul2/neg.
CC3	MF	VT	MDR neg.	
CC4	MF	VT	MDR neg.	
CC5	F/MF	VT	MDR neg.	
CC6	MF	VT	MDR neg.	
CC7	F/MF	VT	MDR neg.	
CC8	F/MF	VT	MDR neg.	Sul2/neg.
CC9	F/MF	VT/ <i>ucaA</i> neg.	MDR neg.	
CC10	F	VT	MDR neg. e pos.	Sul2/neg.
CC11	F/MF	VT	MDR neg.	
CC12	F/MF	VT	MDR neg.	
CC13	F/MF	VT	MDR neg.	Sul2/neg.
CC14	MF	VT	MDR neg.	
CC15	F/MF	VT	MDR neg.	
CC16	F/MF	VT	MDR neg. e pos.	Sul2/neg.
CC17	F/MF	VT/ <i>ucaA</i> neg.	MDR neg.	Sul2
CC18	MF	VT	MDR neg. e pos.	Sul2/neg./sul1 e 2
CC19	MF	VT	MDR neg.	
CC20	MF	VT/ <i>ucaA</i> neg.	MDR neg.	
CC21	F/MF	VT	MDR neg.	
CC22	MF	VT	MDR neg.	
CC23	MF	VT	MDR neg.	
CC24	F/MF	VT/ <i>ucaA</i> neg.	MDR neg. e pos.	Sul2/neg./sul1 e 2
CC25	F/MF	VT	MDR neg.	Sul2/neg.
CC26	F/MF	VT	MDR neg. e pos.	Sul2/neg.
CC27	MF	<i>ucaA</i> neg.	MDR neg. e pos.	
CC28	F/MF	VT/ <i>ucaA</i> neg.	MDR neg.	
CC29	F/MF	VT/ <i>ucaA</i> neg.	MDR neg.	
CC30	MF	VT	MDR neg.	
CC31	MF	<i>ucaA</i> neg.	MDR neg.	
CC32	F/MF	VT/ <i>ucaA</i> neg.	MDR neg.	
CC33	MF	<i>ucaA</i> neg..	MDR neg.	
CC34	F/MF	VT/ <i>ucaA</i> neg.	MDR neg. e pos.	Sul1/sul2/sul 1 e 2/neg.
CC35	MF	VT/ <i>ucaA</i> neg.	MDR neg.	
CC36	MF	VT	MDR neg.	
CC37	MF	VT	MDR neg.	Sul2/neg.
CC38	F/MF	VT	MDR neg. e pos.	
CC39	F	VT	MDR neg.	
CC40	M/F	VT/ <i>ucaA</i> neg.	MDR neg. e pos.	Sul1 e 2/neg.

Legenda: F: Forte; MF: Muito Forte; VT: Virulência Total (cepas que apresentaram todos os genes de virulência); *ucaA* neg: cepas que apresentaram todos os genes, exceto o gene *ucaA*; MDR pos.: resistência a mais de três classes de antimicrobianos; MDR neg.: resistência a menos de três classes de antimicrobianos.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram avaliadas a virulência, a resistência aos antimicrobianos e a diversidade clonal de 183 cepas de *P. mirabilis* isoladas da urina de pacientes com ITU na comunidade de Londrina – PR. Sabe-se que *P. mirabilis* é um importante patógeno causador de infecções do trato urinário, estando relacionado a cerca de 1 a 10% dessas infecções (MIRZAEI et al., 2019).

Segundo os resultados deste estudo, a incidência de ITU adquirida na comunidade é maior em mulheres do que em homens, visto que 79,78% das cepas analisadas foram isoladas de pacientes do sexo feminino; este dado está de acordo com os achados por Mirkalantari et al. (2020) e Manzoor, Ishaq e Kanwal (2020) que encontraram 86,88% e 69,85%, respectivamente. Esse fato ocorre devido a características anatômicas: a uretra das mulheres é mais curta que a dos homens e a contaminação perineal do trato urinário pela microbiota fecal é mais frequente (MOHIUDDIN; NASIRULLAH, 2019).

Do total de cepas avaliadas neste estudo, 14 foram isoladas de crianças até 01 ano de idade. Destas, 10 foram isoladas de pacientes do sexo masculino. As cepas LBUEL–H168, LBUEL–H188 e LBUEL– H219 foram isoladas de um menino de 1 ano de idade, entre fevereiro e abril de 2017 e em três atendimentos distintos, indicando um caso de infecção recorrente. As estimativas de incidência de ITU entre meninos do sexo masculino (especialmente até 01 ano de vida) variam em diferentes populações, provavelmente devido a fatores como a circuncisão, que tem sido associada à uma redução no risco de ITU (KADIGI et al., 2020). Neste contexto, vale ressaltar que *P. mirabilis* é especialmente relacionada a infecções em pacientes com anormalidades estruturais do trato urinário (MIRZAEI et al., 2019). Além disso, sabe-se que crianças com malformação urinária apresentam um número reduzido de infecções por *E. coli* e um maior número de infecções causadas por outros organismos Gram-negativos (PRAIS et al., 2003). Os nossos resultados demonstram que as infecções por *P. mirabilis* tem 5,05 vezes mais chances de ocorrer em homens na faixa etária de 0 a 15 anos ($p < 0,001$ /IC: 3.05-8.34).

O Trimetoprim + Sulfatomexazol foi o antibiótico que apresentou a maior taxa de resistência, seguido da Ampicilina. No estudo realizado por Braoios et

al. (2009), com isolados de *P. mirabilis* de pacientes não hospitalizados com ITU, as cepas analisadas apresentaram alta prevalência de resistência a esses antimicrobianos (53,6% para o Trimetoprim + Sulfatomexazol e 57,9% para a Ampicilina). Em um outro estudo realizado por Costa et al. (2017), as taxas de resistência foram de 48,1% para Ampicilina e 39,3% para Trimetoprim + Sulfametoxazol.

A ampicilina é um antibiótico que faz parte do grupo dos beta-lactâmicos e da classe das penicilinas (NAIRI et al., 2017) e, diferente das outras penicilinas avaliadas neste estudo (Amoxicilina + Ácido clavulânico e Piperacilina + Tazobactam), não possui uma substância inibidora de enzimas beta-lactamases em sua composição. A taxa de resistência para ampicilina encontrada neste estudo, sugere que as cepas resistentes são produtoras de alguma enzima beta-lactamase, pois 99,5% das cepas apresentaram sensibilidade a Amoxicilina + Ácido clavulânico e 100% à Piperacilina + Tazobactam. Segundo nossas análises estatísticas, mulheres na faixa etária de 16 a 31 anos, tem 11,1 vezes mais chances de ter *Proteus mirabilis* com resistência a Ampicilina ($p < 0,001$ /IC: 2.81-43.76); enquanto que as mulheres na faixa etária de 48 a 60 anos possuem 6,91 vezes mais chances ($p < 0,001$ /IC: 2.2-21.68) e as da faixa etária de 80 a 95 anos possuem 3,25 vezes mais chances ($p: 0,024$ /IC: 1.15-9.15).

Na França, um estudo realizado com pacientes da comunidade e internados, constatou que *P. mirabilis* foi o segundo microrganismo (5,2%) mais frequente em urina de pacientes masculinos que fazem o uso de cateter e apresentou altas taxas de resistência para Ampicilina (40%), Amoxicilina (40%), Ticarcilina (42%), Gentamicina (18%), Ácido nalidixico (26%), Norfloxacina (22%), Ciprofloxacina (21%), Trimetoprim + Sulfametoxazol (32%), Fosfomicina (19%) e Nitrofurantoina (100%) (GRAVEY et al., 2017).

Na década de 1990, surgiram os primeiros relatos de cepas de *P. mirabilis* resistentes aos antibióticos betalactâmicos. Essa resistência acontece através da produção de betalactamases e, dentre essas enzimas, ESBL e AmpC são as mais preocupantes pois podem conferir resistência a quase todas as penicilinas e cefalosporinas, além de serem capazes de se disseminarem entre as diversas espécies da Família Enterobacteriaceae, podendo levar a epidemias intra-hospitalares, regionais e continentais (WANG et al., 2014). Um estudo realizado por Nakamura et al. (2012) revelou que, na região de Kinki (Japão), as taxas de

isolamento de *P. mirabilis* produtoras de ESBL aumentaram de 0 para 12,9% no período de 2000 a 2009. Aqui, foi encontrado apenas uma cepa com o fenótipo de ESBL, positiva para o gene CTX-M-9. Castanheira et al. (2015) realizaram um estudo com 8.836 isolados clínicos de enterobactérias e, do total de cepas produtoras de ESBL, 5,2% eram *P. mirabilis*: CTX-M-1 e CTX-M-9 foram os genes predominantes.

Neste estudo, as cepas que apresentaram o fenótipo de resistência a pelo menos um antimicrobiano da classe das quinolonas, sulfonamidas e/ou aminoglicosídeos, foram submetidas à PCR para avaliação da presença de alguns genes de resistência. Os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, e *aac(6')-Ib-cr* não foram encontrados em nenhum dos isolados testados. Das 40 cepas resistentes ao Trimetoprim + Sulfametoxazol, 7 (17,5%) foram positivas para o gene *sul1* e 20 (50%) foram positivas para o gene *sul2*; 4 (10%) cepas apresentaram os dois genes. Esses resultados indicam que a resistência as quinolonas e aos aminoglicosídeos podem estar relacionadas a outros genes não averiguados, assim como as cepas resistentes à sulfonamida Trimetoprim + Sulfametoxazol que não apresentaram a presença dos genes *sul1* ou *sul2*.

Xiao et al. (2019) investigaram a prevalência de alguns genes de resistência em isolados clínicos de *Proteus* spp. (140 *P. mirabilis*, 12 *P. vulgaris* e 1 *P. penneri*) e, entre as 153 amostras, 6 foram positivas para o gene *qnrA*, 3 para o gene *qnrB*, 46 para o gene *qnrD*, 5 para o gene *qnrS* e 45 para o gene *aac(6')-Ib-cr*. Os dados desse estudo quando comparados ao nosso, ressaltam a importância de estudos regionais a fim de se avaliar a presença de genes de resistência em isolados clínicos, visto que a transferência horizontal de genes mediada por plasmídeos é essencial para a aquisição de tais genes.

P. mirabilis está entre os patógenos mais comuns de infecção do trato urinário, cistite e pielonefrite aguda são tipos comuns de ITU causada pela espécie. Além do mais, as infecções por *P. mirabilis* podem resultar na formação de cálculos urinários, com risco de ocasionar graves danos na bexiga e nos rins, e bloqueio de cateteres urinários. A gravidade da ITU causada por *P. mirabilis* depende da expressão de diversos fatores de virulência, formação de biofilme e da resistência às diversas classes de antimicrobianos utilizados contra esses patógenos (MIRZAEI et al., 2019).

Nossos resultados indicam uma alta prevalência dos fatores de virulência entre os isolados estudados: 100% para os genes *hpmA*, *ptA*, *zapA*, *mrpA*, *pmfA*, *ireA* e *atfA*, e 81.42% para o gene *ucaA*. Um estudo realizado por Sanches et al. (2019) demonstrou resultados parecidos: os genes *mrpA*, *pmfA*, *atfA*, *zapA*, *ptA*, *hpmA* e *ireA* foram encontrados em 100% (32) das cepas estudadas, enquanto que o gene *ucaA* foi encontrado em 50% (16) das cepas. Embora estas cepas tenham sido isoladas de carcaças de frango, os resultados evidenciam similaridades entre as cepas de *P. mirabilis* isoladas de ITU em humanos e de outras fontes.

Mirzaei et al. (2019) realizaram um estudo acerca do perfil de virulência de cepas de *P. mirabilis* isoladas de pacientes com ITU e constataram que 100% das amostras foram positivas para os genes *mrpA*, *pmfA* e *hmpA*; enquanto que os genes *zapA*, *ptA* e *ucaA* foram encontrados em 98,2%, 95,5% e 95,5%, respectivamente. Hussein et al. (2020) também encontraram altas taxas em sua pesquisa: 98,4% para o gene *hpmA* e *atfA*; 92,1% para o gene *mrpA*. Esses resultados em conjunto com os nossos, evidenciam as altas taxas de prevalência de genes de virulência encontradas em cepas de *P. mirabilis* uropatogênico.

As fímbrias de *P. mirabilis* são essenciais para o estabelecimento da colonização e patogênese de ITU (ROCHA; PELAYO; ELIAS, 2007) e são de extrema importância para a ligação e migração desses microrganismos em superfícies abióticas (como cateteres de látex e silicone) (SCAVONE et al., 2016). Além disso, essas estruturas são fundamentais para a construção de biofilmes estáveis e persistentes (ALAMURI et al., 2010).

Scavone et al. (2016) realizaram um estudo acerca da contribuição das fímbrias de *P. mirabilis* durante a formação de biofilme e constataram que os mutantes ausentes dos genes *ucaA* e *pmfA* foram capazes de formar biofilme em valores parecidos com as cepas selvagens, sugerindo que essas fímbrias contribuem para o controle da formação de biofilmes estáveis e funcionais e não necessariamente para a adesão bacteriana em biofilmes. Além disso, o mutante que não expressava a fímbria MR/P mostrou o menor valor de formação de biofilme e foi significativamente reduzido em comparação com o restante das cepas, já o mutante que não expressava a fímbria ATF exibiu uma capacidade moderada de formação de biofilme, também significativamente menor que a cepa selvagem. Esses dados sugerem que as diferentes fímbrias de *P. mirabilis* possuem papéis distintos na geração de biofilmes. No nosso estudo, não houve relação significativa entre as

cepas positivas para o gene *ucaA* e as intensidades de formação de biofilme ($p > 0,05$).

A fímbria MR/P é a mais estudada entre todas as fímbrias de *P. mirabilis* e são fundamentais no processo de infecção da bexiga, além de contribuírem na colonização do tecido renal (SCHAFFER; PEARSON, 2015). Rocha et al. (2007) avaliaram o papel de aderência da fímbria MR/P através da mutagênese dessa fímbria e concluíram que houve uma intensa redução do padrão de adesão agregativa da cepa mutante quando comparada a cepa selvagem, confirmando que a fímbria MR/P exibe um importante papel para esse padrão de adesão. Além disso, o gene *mrpA* foi encontrado em 100% das cepas estudadas por estes autores.

A protease ZapA é um fator de virulência importante para o estabelecimento e/ou manutenção da ITU (WALKER et al, 1999), por serem capazes de degradar diversas proteínas de defesa do hospedeiro (incluindo IgA) (CARSON et al., 2011). Um estudo realizado por Phan et al. (2008) teve por objetivo avaliar a importância da protease ZapA nos estágios agudo e crônico da prostatite causada por *P. mirabilis* em ratos. No processo de infecção aguda, a cepa mutante demonstrou números bacterianos mais baixos e alterações histológicas menos graves do que a cepa selvagem, indicando a importância dessa protease durante a fase aguda da infecção. Além disso, os números bacterianos reduzidos da cepa mutante (em comparação com a cepa selvagem) sugerem que, sem a protease ZapA, a capacidade de sobrevivência de *P. mirabilis* na próstata fica comprometida. No estágio crônico de infecção, a infecção pela cepa mutante mostrou uma redução acentuada e parecia haver uma progressão em direção à cura. Esses dados sugerem que ZapA afeta a doença aguda e a resposta do hospedeiro na prostatite.

A secreção de proteínas por bactérias Gram-negativas é frequentemente necessária para o sucesso da virulência desses microrganismos, pois facilita a aquisição de nutrientes e inicia o processo de interação com o hospedeiro. Esta interação pode ser realizada através de proteínas de virulência exclusivas de patógenos bacterianos Gram-negativos, conhecidas como autotransportadores (ALAMURI; MOBLEY, 2008). A toxina Pta se caracteriza por um autotransportador que é capaz de causar a lise em células da bexiga e dos rins (FLANNERY et al., 2009).

Em um estudo realizado por Alamuri et al. (2009), cujo objetivo foi avaliar a atividade das citotoxinas Hpma e Pta em um modelo de ratos com ITU, foi constatado que o mutante com ausência do gene *pta* mas com presença do gene *hpmA*, apresentou cargas bacterianas significativamente diminuídas nos rins e no baço em comparação com as cargas bacterianas alcançadas pela cepa selvagem, o que indica a importância da Pta em conjunto Hpma para o sucesso da colonização pelo patógeno. Neste estudo, os genes *pta* e *hpmA* foram encontrados em 100% das cepas estudadas. Esse achado está de acordo com o resultado encontrado por Cestari et al. (2013) que encontrou o gene *hpmA* em 100% das cepas estudadas.

Os sideróforos (*ireA*) são pequenas moléculas de peso molecular sintetizadas e secretadas por bactérias para quelar o ferro presente no ambiente e o transportar para o meio interno através de receptores específicos na membrana externa (HIMPSL; MOBLEY, 2019). O gene *ireA* foi encontrado em todas as cepas avaliadas.

Neste estudo, todas as cepas testadas apresentaram capacidade em formar biofilme. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Rocha et al. (2007) e Jansen et al. (2004) que encontraram 100% de cepas produtoras de biofilme. As altas taxas de isolados de *P. mirabilis* formadores de biofilme encontrados nesses estudos elucidam a importância dessa estrutura para a patogênese da espécie, além de serem preocupantes, visto que a formação de biofilme é capaz de ocasionar o entupimento de cateteres urinários e dificultar a antibioticoterapia e resposta imunológica do hospedeiro.

Nós avaliamos a diversidade genética entre as cepas de *P. mirabilis* estudadas. Foram encontrados quarenta complexos clonais diferentes e alguns deles abrigaram apenas cepas com as mesmas características de virulência e resistência (genotípicas e fenotípicas), enquanto que outros abrigaram cepas com características distintas. Isso sugere que algumas características podem ter sido adquiridas através da aquisição de plasmídeos, através de mutações ou através de outro mecanismo desconhecido. Todos os clones encontrados diferem com relação à UBS e, conseqüentemente, a localidade em que foram isolados, sugerindo a circulação de cepas de *P. mirabilis* uropatogênico na cidade de Londrina.

Uma pesquisa realizada por Sosa, Schlapp e Zunino (2006) com isolados de *P. mirabilis* de diversas fontes (ITU, ferida, secreção respiratória, carne e isolados de outros animais) revelou que não existem relações clonais (através da

técnica de ERIC-PCR) entre as cepas estudadas. Os isolados clínicos e não clínicos mostraram capacidades semelhantes em causar ITU em camundongos e, nesse contexto, vale ressaltar que independente da origem e da diversidade genética, *P. mirabilis* é comumente caracterizado como um importante patógeno de infecções do trato urinário.

De forma geral, os nossos resultados evidenciam que cepas de *P. mirabilis* isoladas de ITUs na cidade de Londrina, podem ser distribuídas em diversos complexos clonais. Além disso, observamos que podem existir cepas geneticamente relacionadas circulando nas mesmas UBSs e clones circulantes na cidade.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que as cepas de *P. mirabilis* uropatogênicas isoladas de UBS possuem várias características de virulência, incluindo a produção de citotoxinas, fímbrias e sistemas de aquisição de ferro, se caracterizando como um importante patógeno causador de ITU na comunidade. A alta capacidade desse patógeno em formar biofilme revela-se como um fator preocupante em casos de infecções consideradas complicadas, visto que isso dificulta a antibioticoterapia. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos revelou que algumas cepas de *P. mirabilis* estudadas possuem resistência a antibióticos comumente utilizados para o tratamento de infecções do trato urinário. Além disso, foi observado que existem clones de *P. mirabilis* circulantes na cidade de Londrina, bem como cepas geneticamente similares nas UBSs avaliadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

ALAMURI, P.; EATON, K. A.; HIMPSL, S. D.; SMITH, S. N.; MOBLEY, H. L. T. Vaccination with Proteus Toxic Agglutinin, a Hemolysin-Independent Cytotoxin In Vivo, Protects against *Proteus mirabilis* Urinary Tract Infection. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 632-641, 2009.

ALAMURI, P.; LOWER, M.; HISS, J. A.; HIMPSL, S. D.; SCHNEIDER, G.; MOBLEY, H. L. T. Adhesion, Invasion, and Agglutination Mediated by Two Trimeric Autotransporters in the Human Uropathogen *Proteus mirabilis*. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 4882-4894, 2010.

ALAMURI, P.; MOBLEY, H. L. T. A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both cytotoxin and an agglutinin. **Molecular Microbiology**, v. 68, p. 997-1017, 2008.

ALGBURI, A.; ALAZZAWI, S. A.; AL-EZZY, A. I. A.; WEEKS, R.; CHISTYAKOV, V.; CHIKINDAS, M. L. Potential Probiotics *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 Co-Aggregate with Clinical Isolates of *Proteus mirabilis* and Prevent Biofilm Formation. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-13, 2020.

BRAOIOS, A.; TURATTI, T. F.; MEREDIJA, L. C. S.; CAMPOS, T. R. S.; DENADAI, F. H. M. Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, p. 449-456, 2009.

CARSON, L.; CATHCART, G.; SCOTT, C.; HOLLENBERG, M.; WALKER, B.; CERI, H.; GILMORE, B. Comprehensive inhibitor profiling of the *Proteus mirabilis* metalloprotease virulence factor ZapA (mirabilysin). **Biochimie**, v. 93, p. 1824-1827, 2011.

CASTANHEIRA, M.; MILLS, J. C.; COSTELLO, S. E.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Ceftazidime-Avibactam Activity Tested against *Enterobacteriaceae* Isolates from U.S. Hospitals (2011 to 2013) and Characterization of β -Lactamase-Producing Strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, p. 3509-3517, 2015.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; ROTIMI, M.; SOUSSY, C. L.; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 394-397, 2007.

CAVACO, L. M.; HASMAN, H.; XIA, S.; AARESTRUP, F. M. *qnrD*, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 603-608, 2009.

CESTARI, S. E.; LUDOVICO, M. S.; MARTINS, F. H.; ROCHA, S. P. D.; ELIAS, W. P.; PELAYO, J. S. Molecular Detection of HpmA and HlyA Hemolysin of Uropathogenic *Proteus mirabilis*. **Current Microbiology**, v. 67, p. 703-707, 2013.

CHEN, C.; CHEN, Y.; LU, P.; LIN, W.; CHEN, T.; LIN, C. *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: Risk factors, clinical presentation, and outcomes. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 45, p. 228-236, 2012.

CHEN, X.; ZHANG, W.; PAN, W.; YIN, J.; PAN, Z.; GAO, S.; JIAO, X. Prevalence of *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* Isolates from Humans, Animals, and the Environment. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 3423-3427, 2012.

Clinical and Laboratory Institute (CLSI) (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. **CLSI Supplement M100**, 2018.

COSTA, T.; LINHARES, I.; FERREIRA, R.; NEVES, J.; ALMEIDA, A. Frequency and Antibiotic Resistance of Bacteria Implicated in Community Urinary Tract Infections in North Aveiro Between 2011 and 2014. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, p. 493-504, 2017.

DURGADEVI, R.; ABIRAMI, G.; ALEXPANDIM, R.; NANDHINI, K.; KUMAR, P.; PRAKASH, S.; RAVI, A. V. Explication of the Potential of 2-Hydroxy-4-Methoxybenzaldehyde in Uropathogenic *Proteus mirabilis* Crystalline Biofilm and Virulence. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-16, 2019.

FLANNERY, E. L.; MODY, L.; MOBLEY, H. L. T. Identification of a Modular Pathogenicity Island That Is Widespread among Urease-Producing Uropathogens

and Shares Features with a Diverse Group of Mobile Elements. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 4887-4894, 2009.

GRAVEY, F.; LOGGIA, G.; DE LA BLANCHARDIERE, A.; CATTOIR, V. Bacterial epidemiology and antimicrobial resistance profiles of urinary specimens of the elderly. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 47, p. 271-278, 2017.

HIMPSL, S. D.; MOBLEY, H. L. T. Siderophore Detection Using Chrome Azurol S and Cross-Feeding Assays. **Methods in Molecular Biology**, v. 2021, p. 97-108, 2019.

HUNG, C.; MARSCHALL, J.; BURNHAM, C. D.; BYUN, A. S.; HENDERSON, J. P. The Bacterial Amyloid Curli Is Associated with Urinary Source Bloodstream Infection. *PloS One*, v. 9, p. 1-6, 2014.

HUSSEIN, E. I.; AL-BATAYNEH, K.; MASADEH, M. M.; DAHADHAH, F. W.; ZOUBI, M. S.; ALJABALI, A. A.; ALZOUBI, K. H. Assesment of Pathogenic Potential, Virulent Genes Profile, and Antibiotic Susceptibility of *Proteus mirabilis* from Urinary Tract Infection. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1-5, 2020.

JANSEN, A. M.; LOCKATELL, V.; JOHNSON, D. E.; MOBLEY, H. L. T. Mannose-Resistant *Proteus*-Like Fimbriae Are Produced by most *Proteus mirabilis* Strains Infecting the Urinary Tract, Dictate the In Vivo Localization of Bacteria, and Contribute to Biofilm Formation. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 7294-7305, 2004.

JUAREZ, G. E.; MATEYCA, C.; GALVAN, E. M. *Proteus mirabilis* oucompetes *Klebsiella pneumoniae* in artificial urine medium through secretion of ammonia and other volatile compunds. **Helyon**, v. 6, p. 1-9, 2020.

KADIGI, D. M.; MOSHA, F.; MOYO, S.; MATEE, M. I. Etiology an Antimicrobial Susceptibility Patterns of Bacterial Agents Causing Urinary Tract Infection in Children under Five years, dar es Salaam. **Journal of Biotechnology and Immunology**, v. 2, p. 1-12, 2020.

KO, Y. H.; CHOI, J. Y.; SONG, P. H. Host-Pathogen Interactions in Urinary Tract Infections. **Urogenital Tract Infection**, v. 14, p. 71-79, 2019.

KWIECINSKA-PIRÓG, J.; BOGIEL, T.; SKOWRON, K.; WIECKOWSKA, E.; GOSPODAREK, E. *Proteus mirabilis* biofilm - Qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1423–1431, 2014.

LI, Q.; SHERWOOD, J. S.; LOGUE, C. M. Characterization of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from processed bison carcasses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2361-2369, 2007.

MANZOOR, A.; ISHAQ, N.; KANWAL, A. Incidence, Distribution And Management of Community Acquired Urinary Tract Infection Among Patients In Hospitals of Lahore, Pakistan. **International Journal of Biotech Trends and Technology**, v. 10, p. 15-21, 2020.

MICHELIM, L.; MULLER, G.; ZACARIA, J.; DELAMARE, A. P. L.; COSTA, S. O. P.; ECHEVERRIGARAY, S. Comparison of PCR-based molecular markers for the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p.423-429, 2008.

MIRKALANTARI, S.; MASJEDIAN, F.; IRAJIAN, G.; SIDDIG, E. E.; FATTAHI, A. Determination of the frequency of β -lactamase genes (*bla SHV*, *bla TEM*, *bla CTX-M*) and phylogenetic groups among ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from outpatients. **Journal of Laboratory Medicine**, v. 44, p. 27-33, 2020.

MIRZAEI, A.; HABIBI, M.; BOUZARI, S.; KARAM, M. R. A. Characterization of Antibiotic-Susceptibility Patterns, Virulence Factor Profiles and Clonal Relatedness in *Proteus mirabilis* Isolates from Patients with Urinary Tract Infection in Iran. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 3967-3979, 2019.

MOHIUDDIN, A. K.; NASIRULLAH, M. UTIs among patients with Chronic Health Situations. **Journal of Medical and Clinical Studies**, v. 2, p. 121-130, 2019.

NAIRI, V.; MEDDA, L.; MONDUZZI, M.; SALIS, A. Adsorption and release of ampicillin antibiotic from ordered mesoporous silica. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 497, p. 217-225, 2017

NAKAMURA, T.; KOMATSU, M.; YAMASAKI, K.; FUKUDA, S.; MIYAMOTO, Y.; HIGUCHI, T.; ONO, T.; NISHIO, H.; SUEYOSHI, N.; KIDA, K.; SATOH, K.; TODA, H.; TOYOKAWA, M.; NISHI, I.; SAKAMOTO, M.; AKAGI, M.; NAKAI, I.; KOFUKU, T.; ORITA, T.; WADA, Y.; ZIKIMOTO, T.; KOIKE, C.; KINOSHITA, S.; HIRAI, I.; TAKAHASHI, H.; MATSUURA, N.; YAMAMOTO, Y. Epidemiology of *Escherichia coli*, *Klebsiella* Species, and *Proteus mirabilis* Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases From Clinical Samples in the Kinki Region of Japan. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 137, p. 620-626, 2012.

NATARO, J. P.; DENG, Y.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S. J.; GUERS, L. D.; LEVINE, M. M.; TACKET, C. O. Heterogeneity of Enteroaggregative *Escherichia coli* Virulence Demonstrated in Volunteers. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, p. 465-468, 1995.

NGUYEN, J.; HARB, L. MORELAND, R.; LIU, M.; GILL, J. J.; RAMSEY, J. Complete Genome Sequence of *Proteus mirabilis* Siphopage Saba. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, p. 1-2, 2019.

PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2153-2162, 2002.

PHAN, V.; BELAS, R.; GILMORE, B. F.; CERI, H. ZapA, a Virulence Factor in a Rat Model of *Proteus mirabilis* - Induced Acute and Chronic Prostatitis. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 4859-4864, 2008.

PRAIS, D.; STRAUSSBERG, R.; AVITZUR, Y.; NUSSINOVITCH, M.; HAREL, L.; AMIR, J. Bacterial susceptibility to oral antibiotics in community acquired urinary tract infection. **Archives disease in childhood**, v. 88, p. 215-218, 2003.

ROCHA, S. P. D.; ELIAS, W. P.; CIANCIARULLO, A. M.; MENEZES, M. A.; NARA, J. M.; PIAZZA, R. M. F.; SILVA, M. R. L.; MOREIRA, C. G.; PELAYO, J. S. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, p. 319-326, 2007.

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

RODRIGUEZ, L. E. C.; RIGAU, L. D.; OLIVA, S. D.; MIRAYA, A. C.; GARCIA, G. O. Multirresistencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes con infección del tracto urinario adquirida en la comunidad. **Revista Cubana de Medicina General Integral**, v. 35, p. 26-40, 2019.

SANCHES, M. S.; BAPTISTA, A. A. S.; SOUZA, M.; MENCK-COSTA, M. F.; KOGA, V. L.; KOBAYASHI, R. K. T.; ROCHA, S. P. D. 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, p. 685-694, 2019.

SCAVONE, P.; IRIBARNEGARAY, V.; CAETANO, A. L.; SCHLAPP, G.; HARTEL, S.; ZUNINO, P. Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 74, p. 1-9, 2016.

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

SOSA, V.; SCHLAPP, G.; ZUNINO, P. *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. **Microbiology**, v. 152, p. 2149-2157, 2006.

TUMTURK, A.; TONYALI, S.; TEKCE, A. Y. T.; ISIKAY, L.; CIME, H. Fosfomicin in the treatment of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae-related urinary tract infections. **The Journal of Infection In Developing Countries**, v. 13, p. 73-76, 2019.

WALKER, K. E.; MOGHADDAME-JAFARI, S.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D.; BELAS, R. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 825-836, 1999.

WANG, J. T.; CHEN, P. C.; CHANG, S. C.; SHIAU, Y. R.; WANG, H. Y.; LAI, J. F.; HUANG, I. W.; TAN, M. C.; LAUDERDALE, T. L. Y.; TSAR HOSPITALS. Antimicrobial susceptibilities of *Proteus mirabilis*: a longitudinal nationwide study from the Taiwan surveillance of antimicrobial resistance (TSAR) program. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 486-495, 2014.

WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum B-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 154-155, 2006.

XIAO, L.; WANG, X.; KONG, N.; CAO, M.; ZHANG, L.; WEI, Q.; LIU, W. Polymorphisms of Gene Cassette Promoters of the Class I Integron in Clinical *Proteus* Isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1-12, 2019.

ZUBAIR, K. U.; SHAH, A. H.; FAWWAD, A.; SABIR, R.; BUTT, A. Frequency of urinary tract infection and antibiotic sensitivity of uropathogens in patients with diabetes. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 35, p. 1664-1668, 2019.

ZUNINO, P.; GEYMONAT, L.; ALLEN, A. G.; LEGNANI-FAJARDO, C.; MASKELL, D. J. Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, p.137-143, 2000.

ZUNINO, P.; SOSA, V.; ALLEN, A. G.; PRESTON, A.; SCHLAPP, G.; MASKELL, D. J. *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. **Microbiology**, v. 149, p. 3231-3237, 2003.