



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TAYNARA DE LACQUA WALDRICH

**CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DOS
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Proteus mirabilis*
UROPATOGÊNICO**

Londrina
2017

TAYNARA DE LACQUA WALDRICH

**CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DOS
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Proteus mirabilis*
UROPATOGÊNICO**

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
2017

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

Waldrich, Taynara de Lacqua.

Características genotípicas e fenotípicas dos fatores de virulência de proteus mirabilis uropatogênico / Taynara de Lacqua Waldrich. - Londrina, 2017.
59 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, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Proteus (Bactéria) - Tese. 2. Virulência (Microbiologia) - Tese. 3. Infecções urinárias - Tese. I. Rocha, Sérgio Paulo Dejato da. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

TAYNARA DE LACQUA WALDRICH

**CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DOS
FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Proteus mirabilis*
UROPATOGÊNICO**

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. Jacinta Sanchez Pelayo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de janeiro de 2017.

Por sempre estarem ao meu lado, dedico este trabalho especialmente aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, Cintia e Valdir, por todo amor, incentivo e apoio nestes anos de estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha, por ter me recebido de braços abertos no laboratório, pela paciência, ensinamentos, amizade e ajuda em tudo que precisei.

À Prof^a. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo, pelos ensinamentos e contribuição para a realização deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório de Bacteriologia, Angélica, Caroline, Kawana, Anahí, Gustavo, Antônio e Claci pela amizade.

Ao laboratório de Virologia, pelos auxílios prestados.

Ao professor Guilherme Biz pela atenção e ajuda na realização dos gráficos de estatística.

À minha turma do mestrado, pela amizade e companheirismo.

As minhas queridas amigas, Rosemary, Aline e Natália, por todos os momentos de alegria.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!!!

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

WALDRICH, Taynara de Lacqua. **Características genotípicas e fenotípicas dos fatores de virulência de *proteus mirabilis* uropatogênico**. 2017. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A infecção do trato urinário (ITU) está entre as infecções mais prevalentes responsáveis por processos infecciosos, comunitários e hospitalares, sendo *Proteus mirabilis* um dos principais agentes causais de ITU. Alguns de seus fatores de virulência já foram caracterizados constituindo-se de elementos como flagelo, enzimas, toxinas, sideróforos e adesinas. As infecções causadas por esse bacilo são caracterizadas como de longa permanência e difícil tratamento, podendo muitas vezes levar ao óbito. Com o intuito de contribuir para o estudo dos principais fatores de virulência deste importante patógeno humano, foram analisadas 47 amostras da coleção do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Estadual de Londrina onde as mesmas foram caracterizadas genotipicamente pela técnica da PCR e fenotipicamente, pela formação de cristais, biofilme, citotoxicidade e o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de uso clínico de *P. mirabilis* uropatogênicos. Quanto aos genes de virulência, foram encontrados 56,25% *hpmA*, 52,08% *hpmB*, 68,75% *ptA*, 0% *hlyA*, 100% *ureA*, 6,25% *zapA*, 14,58% *mrpA*, 70,83% *fimH*, 77,08% *pmfA*, 85,41% *ucaA*, 54,16% *ireA* e 0% *ecpA*. Todas apresentaram capacidade em formar cristais *in vitro*, 90% das amostras formaram biofilme e apresentaram atividade citotóxica. As amostras apresentaram grande sensibilidade e nenhuma das 47 amostras foram ESBL positivas. Portanto, devido a expressão de sua potente urease, deve-se tomar o devido cuidado na escolha do antibiótico a ser utilizado no tratamento da ITU por esta bactéria, pois nem sempre a sensibilidade observada *in vitro* é a mesma que *in vivo* devido a produção de cristais.

Palavras-chave: *Proteus mirabilis*. Infecção do trato urinário. Fatores de virulência.

WALDRICH, Taynara de Lacqua. **Genotypic and phenotypic characteristics of uropathogenic *proteus mirabilis* virulence factors**. 2017. 59 p. Dissertation (Master in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Urinary tract infection (UTI) is among the most prevalent infections and accounts for much of the infectious, community and hospital processes. *Proteus mirabilis* is one of the main causative agents of UTI. Some of their virulence factors have been characterized constituting elements such as flagellum, enzymes, toxins, siderophores and adhesins. Infections caused by this bacillus are characterized as long-term and difficult to treat and can often lead to death. In order to contribute to the understanding of epidemiology main virulence factors, were analyzed 47 samples of the collection of Bacteriology Laboratory of State University of Londrina where they were characterized genotypically (by PCR) and phenotypically (crystal formation and biofilm) of uropathogenic *P. mirabilis*. Were found 56,25% *hpmA*, 52,08% *hpmB*, 68,75% *ptA*, 0% *hlyA*, 100% *ureA*, 6,25% *zapA*, 14,58% *mrpA*, 70,83% *fimH*, 77,08% *pmfA*, 85,41% *ucaA*, 54,16% *ireA* e 0% *ecpA*. All were able to form crystals in vitro, 90% of the samples formed biofilm and presented cytotoxic activity. The samples showed great sensitivity and none of the 47 samples were ESBL positive. Therefore, due to the expression of its potent urease, due care should be taken in the choice of antibiotic to be used in the treatment of UTI by this bacterium, since the sensitivity observed in vitro is not always the same as in vivo due to the production of crystals.

Keywords: *Proteus mirabilis*. Urinary tract infection. Virulence factors.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Infecção do Trato Urinário	11
2.2	<i>Proteus sp</i>	13
2.3	<i>Proteus mirabilis</i> uropatogênico	14
2.4	Fatores de virulência de <i>P. mirabilis</i>	14
2.4.1	Hemolisina	15
2.4.2	<i>Proteus toxic agglutinin</i> (Pta).....	16
2.4.3	Flagelo.....	17
2.4.4	Urease	18
2.4.5	Proteases	19
2.4.6	Sideróforos	19
2.4.7	Adesinas.....	20
2.5	Sensibilidade a Antimicrobianos de Uso Clínico	22
	REFERÊNCIAS	24
	ARTIGO CIENTÍFICO	36
	CONCLUSÕES	59

1 INTRODUÇÃO

A infecção do trato urinário (ITU) está entre as infecções mais prevalentes nos países desenvolvidos e ocorre quando há comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro, associado à aderência, multiplicação e persistência de um patógeno em uma região do trato genito-urinário. Os fatores complicadores do hospedeiro e os fatores de virulência da bactéria são os que facilitam o estabelecimento e, a manutenção da bacteriúria ou o agravamento que acometem os rins.

Há diversos patógenos relacionados com a ITU, sendo a *Escherichia coli* a mais prevalente, seguindo de *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Enterococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp e *Pseudomonas* spp.

Dentre os patógenos causadores desta infecção, *Proteus mirabilis* se destaca devido aos seus fatores de virulência como a sua rápida mobilidade, fenômeno denominado *swarming*, capaz de invadir e colonizar o tecido hospedeiro e a produção de urease, responsável pela formação de cálculos e danos teciduais e por este motivo tendem ser mais graves, persistentes e de difícil tratamento. Assim sendo, neste presente trabalho, foram avaliados os principais fatores de virulência desta bactéria como também, a sua capacidade de formar cristais *in vitro* e biofilme em placas de poliestireno.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção do Trato Urinário

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das infecções mais comuns, afeta mais de 25% da população nos países desenvolvidos, especialmente as mulheres jovens (PARN et al., 2016; GENAO; BUHR, 2012; FOXMAN, 2002). Responde por grande parte dos processos infecciosos, comunitários e hospitalares, seguido das infecções respiratórias, sendo que 80% das pessoas cateterizadas desenvolvem ITU (VIEIRA, 2003; COELHO et al., 2008; RUMMUKAINEN et al., 2013).

A ITU é definida como colonização microbiana e invasão tissular de algum sítio do trato genito-urinário, sendo capaz de ultrapassar a capacidade defensiva do hospedeiro e causar lesão (MENIN; GRAZZIOTIN, 2010). Todas as porções do trato urinário têm a possibilidade de serem infectadas: o rim, a pelve renal, os ureteres, a bexiga, a uretra, a próstata e o epidídimo (SATO et al., 2005; FREITAS et al., 2016).

Segundo Goldman e Ausielo (2009), as ITUs são classificadas pelo tipo de infecção, presença ou ausência de sintomas, tendência à recorrência e presença ou ausência de fatores complicadores. As infecções recorrentes podem ser subdivididas em reinfecções causadas por novas cepas bacterianas ou pelas mesmas cepas que causaram as infecções presentes. Os fatores complicadores são do hospedeiro, que facilitam o estabelecimento e, a manutenção da bacteriúria ou o agravamento do prognóstico das ITUs que acometem os rins.

A maior suscetibilidade à infecção no sexo feminino é devida às condições anatômicas: uretra mais curta e maior proximidade entre vagina e ânus, episódios prévios de cistite, o ato sexual, a gestação, diabetes e a higiene deficiente (HOOTON, 2000; VALIQUETTE, 2001; FIHN, 2003; LOPES; TAVARES, 2005).

No adulto do sexo masculino, favorece a ITU a instrumentação das vias urinárias, incluindo-se o cateterismo vesical, e a hiperplasia prostática. Sendo a ITU adquirida em hospital, considerada a principal causa de bacteremia por bacilos Gram-negativos (LOPES; TAVARES, 2005; WARREN, 1997; PEWITT; SCHAEFFER, 1997).

Segundo Hooton e Stamm (1997), a infecção do trato urinário baixo (cistite), quando sintomática, exterioriza-se clinicamente pela presença habitual de disúria, urgência miccional, polaciúria, nictúria e dor suprapúbica. O aspecto da urina pode também trazer informações valiosas: urina turva (pela presença de piúria) e/ou avermelhada (pela presença de sangue), causada por cálculo e/ou pelo próprio processo inflamatório.

Já a infecção do trato urinário alto (pielonefrite), que habitualmente se inicia como um quadro de cistite é habitualmente acompanhado de febre, calafrios e dor lombar. A dor lombar pode se irradiar para o abdômen ou para o(s) flanco(s) e, mais raramente, para a virilha, situação que sugere mais fortemente a presença de cálculo, com ou sem infecção, na dependência da presença dos outros sintomas relacionados. Os sintomas gerais de um processo infeccioso agudo podem também estar presentes, e sua intensidade é diretamente proporcional à gravidade da pielonefrite (RONALD; HARDING, 1997; LOPES; TAVARES, 2005).

P. mirabilis é um importante causador de ITU (BAHASHWAN; SHAFEY, 2013), embora *E. coli* seja a bactéria responsável pela maioria dos casos, as infecções causadas por *Proteus sp* são significantes devido aos seus fatores de virulência como a produção de urease, responsável pela formação de cálculos e danos teciduais e por este motivo tendem ser mais graves e persistentes. Cerca de 44% das infecções urinárias associadas ao uso de cateteres nos Estados Unidos envolvem *P. mirabilis* (JACOBSEN et al., 2008; O'HARA et al., 2000), a qual é conhecida por ser frequentemente persistente e de difícil tratamento, podendo ser fatal, dependendo da severidade da infecção. Outras bactérias também podem causar ITU como: *Klebsiella spp*, *Citrobacter spp*, *Enterococcus spp* e *Staphylococcus spp* (APOLINÁRIO et al., 2014; COKER et al., 2000).

As infecções do trato urinário, associadas à sondagem vesical de demora, estão entre 8% e 35% das infecções em centros de terapia intensiva (CTIs). As infecções do trato urinário mais comuns foram as bacteriúrias assintomáticas (WAGENLEHNER et al., 2006; VINCENT et al., 2003.; MCCUSKER et al., 2002). Um estudo realizado no CTI entre agosto de 2005 e janeiro de 2008 no Brasil, demonstrou que essas foram responsáveis por 37,6% das infecções notificadas no CTI, sendo 76,4% assintomáticas e 33,6% sintomáticas (OLIVEIRA et al., 2010).

O risco de ITU está relacionado com o tempo de permanência do cateter e, nos pacientes idosos e deficientes cateterizados por meses ou anos, a

presença de bactéria na urina é inevitável (KUNIN, 1997). Os cateteres de longa permanência tornam-se colonizados por biofilmes extensos, os quais têm efeito profundo na saúde do paciente, sendo o biofilme cristalino o mais agressivo (GETLIFFE; MULHALL, 1991).

Os microrganismos que produzem ITU são os mais frequentes encontrados nesses processos infecciosos, representam em torno de 70 a 80% das amostras isoladas na rotina de laboratório (FOXMAN, 2014).

2.2 *Proteus sp*

O gênero *Proteus* pertence à família Enterobacteriaceae e é amplamente distribuído na natureza. O traço marcante que o diferencia de outros membros desta família é o *swarming*, uma diferenciação celular que facilita a movimentação e é importante no processo infeccioso (WILLIAMS; SCHWARZHOF, 1978; MOBLEY; BELAS, 1995). Bactérias deste gênero são bacilos Gram-negativos, dimórficos, anaeróbios facultativos, móveis com flagelos peritríqueos (ZUNINO et al., 2001). Esses microrganismos exibem atividade proteolítica sob condições de aerobiose e anaerobiose facultativa. A desaminação oxidativa de aminoácidos (triptofano e fenilalanina) e a habilidade de hidrolisar ureia com a produção de amônia e dióxido de carbono são as propriedades bioquímicas mais representativas deste gênero (MELO, 2010).

Proteus spp. apresentam uma taxa de degradação de ureia de 6 a 30 vezes mais rápida quando comparada com outros microrganismos produtores de urease. Esta é uma das razões pelo qual esta bactéria está relacionada com danos histológicos mais severos que as ITU causadas por *E.coli* e *Klebsiella* spp (JONES; MOBLEY, 1987; JOHSON et al., 1993).

O gênero *Proteus* é composto por quatro espécies: *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri* e *P. myxofaciens*, sendo a última não relacionada à infecção em humanos (O'HARA et al., 2000). A espécie mais comum é *P. mirabilis* que, de longe, é o membro mais estudado (MANOS; BELAS, 2006).

2.3 *Proteus mirabilis* uropatogênico

P. mirabilis é uma bactéria oportunista capaz de colonizar e infectar seres humanos, principalmente com deficiências anatômicas e fisiológicas (ROZALSKI et al., 1997). Frequentemente relacionada com infecções urinárias, facilitadas pela sua capacidade em degradar ureia, tem sido encontrado colonizando cateteres vesicais (MICHELIM, 2008).

Segundo Chow et al. (1979), estas infecções podem ser divididas em duas categorias: infecções sistêmicas ou hematogênicas e infecções ascendentes, na qual ocorre a colonização de todo o trato urinário, desde a uretra até o rim, sendo esta o tipo mais frequente (LI et al., 2002; PEARSON et al., 2008).

As complicações frequentes são urolitíase, obstrução de cateteres urinários, litíase vesical, além de complicações renais como pielonefrite (PEARSON et al., 2008). São caracterizadas como de longa permanência e difícil tratamento, podendo muitas vezes levar ao óbito (PENNER, 1992).

Bahaswan e Shafey (2013), descreveram que *P. mirabilis* é considerado uma das principais causas de infecções hospitalares. Correspondendo a 12% dos processos infecciosos, já em bacteriúria por cateter de longa permanência, é o segundo agente mais frequente após *E. coli*, ocorrendo em 15% dos casos (HIMPSON et al., 2008).

Há diversos fatores de patogenicidade que favorecem a participação de *P. mirabilis* em processos infecciosos, tais como: a capacidade de mobilidade, adesão as células do hospedeiro, produção de protease, urease e hemolisina. A correta co-regulação desses fatores de virulência durante a diferenciação de *swarming* está relacionada com a capacidade de colonizar e invadir o tecido do hospedeiro (MICHELIM, 2008).

2.4 Fatores de virulência de *P. mirabilis*

Os fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias que as bactérias utilizam para colonização e desencadear a infecção. Alguns estão relacionados com a colonização do microrganismo e outros com as lesões do

organismo hospedeiro. *P. mirabilis* possui diversos fatores de virulência que contribuem para as ITUs tais como: hemolisina, toxinas, cápsula, enzimas, flagelo, sideróforos, adesinas e biofilme (NIELUBOWICZ et al., 2010) (Figura 01).

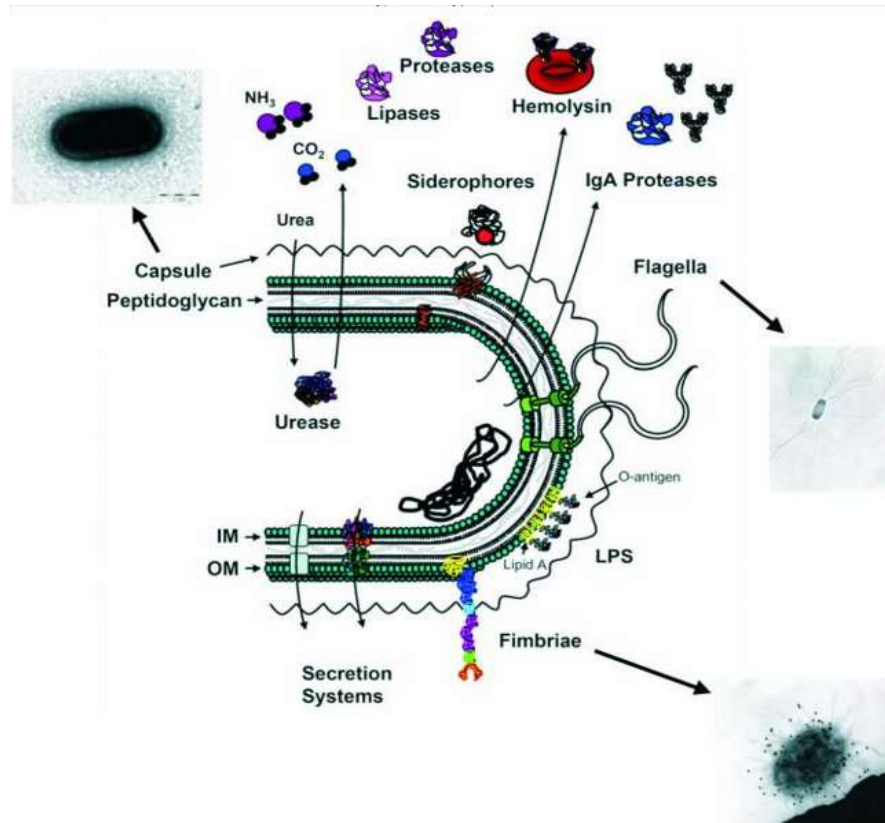


Figura 1 - Fatores de Virulência de *P. mirabilis* uropatogênico.

Fonte: JACOBSEN, S. M.; STICKLER, D. J.; MOBLEY, H. L. T, 2008.

2.4.1 Hemolisina (Hpm)

A hemolisina é uma toxina que se insere na membrana da célula eucariótica causando dano celular. Ela facilita a propagação de bactérias dentro do rim e desenvolvimento de pielonefrite durante a ITU. A hemolisina secretada por *P. mirabilis*, denominada de Hpm é extremamente comum em isolados clínicos, apresentando essa atividade hemolítica tanto na ausência (extracelular), quanto na presença de contato hemácia/bactéria (HACKER; HUGHES, 1985; MOBLEY; CHIPPENDALE, 1990). Os genes da hemolisina de *P. mirabilis* são *hpmA* e *hpmB*, que codificam as proteínas HpmA e HpmB, respectivamente. HpmB transporta e

ativa HpmA. HpmA é encontrada no periplasma e sua produção parece estar na dependência da regulação da síntese de flagelo durante a diferenciação em células hiperflageladas capazes de realizar *swarming* (MICHELIM, 2008; ALLISON et al., 1992b), enquanto HpmB é provavelmente encontrada na membrana externa, participando do processo de secreção de HpmA (LUKOMSKI et al., 1991).

Segundo Coker (2000), as hemolisinas de *P. mirabilis* são toxinas formadoras de poros que se inserem em alvos da membrana de células eucariontes, não sendo considerado um fator essencial na fase inicial da infecção do trato urinário inferior. Podem ser detectadas através da lise de hemácias de sangue de carneiro pela visualização de um halo de hemólise ao redor do crescimento bacteriano em ágar sangue (MORGAN et al., 1985).

A produção de várias proteínas de virulência é regulada positivamente durante o ciclo *swarmer* de *Proteus*, sendo que a síntese e secreção da hemolisina HpmA é modulada em paralelo com a expressão do gene flagelar, com atividade hemolítica aproximadamente 20 vezes maior em células *swarm* hiperflageladas do que em células vegetativas (FRASER et al., 2002; ALLISON et al., 1992).

2.4.2 *Proteus toxic agglutinin* (Pta)

O gene *ptA* de *P. mirabilis* HI4320 codifica a proteína Pta que é auto transportadora com ação proteolítica (KLUSKENS et al., 2002).

A Pta foi caracterizada como uma proteína que medeia a agregação de célula-célula e também contém um α -domínio cataliticamente ativo capaz de lisar células do rim e da bexiga (FLANNERY et al., 2009; ALAMURI et al., 2008). A inativação simultânea causada por uma mutação de *ptA* e *hpmA* resulta numa maior redução da citotoxicidade, indicando que HpmA e Pta têm um efeito aditivo. (FLANNERY et al., 2009).

2.4.3 Flagelo

O flagelo facilita a colonização e disseminação a partir do local inicial da instalação do microrganismo. Em *P. mirabilis*, é responsável pelo fenômeno *swarming*, o qual faz a ascensão da bactéria do ureter aos rins (células alongadas, 5um – 80um de comprimento e hiperflagelados) ou *swimmer* (bastonete com 1um a 2um de comprimento, móveis com 6 a 10 flagelos peritríqueos por célula) (Figura 02). A mudança da forma de *swarming* para *swimmer* é uma resposta adaptativa da bactéria ao ambiente do hospedeiro para facilitar a colonização no trato urinário (MOBLEY, 2000).

A visualização das conexões helicoidais formadas em *swarming* durante a migração revela que estas ligações consistem em filamentos de flagelos entrelaçados de células *swarming* adjacentes (JONES et al., 2004). A maioria das cepas de *P. mirabilis* são incapazes de se diferenciar em células *swarming* em meio líquido, sem a adição de um agente espessante, por isso pensa-se que a diferenciação é acionada por contato com a superfície ou inibição de rotações flagelares (HART et al., 2011; CALVO, 1994). A decisão para forma *swarming* parece ser influenciada pelo estado metabólico e à presença de aminoácidos específicos, incluindo histidina e glutamina, que são dois dos aminoácidos mais concentrados em urina humana (TAN; GAJRA, 2006).

Além de proporcionar mobilidade para as bactérias o flagelo pode ser ainda mais relevante na patogenicidade bacteriana, atuando também como adesina, promovendo a formação de biofilme, translocação de proteínas de virulência ou desencadeamento de respostas pró-inflamatórias (DUAN et al., 2013).

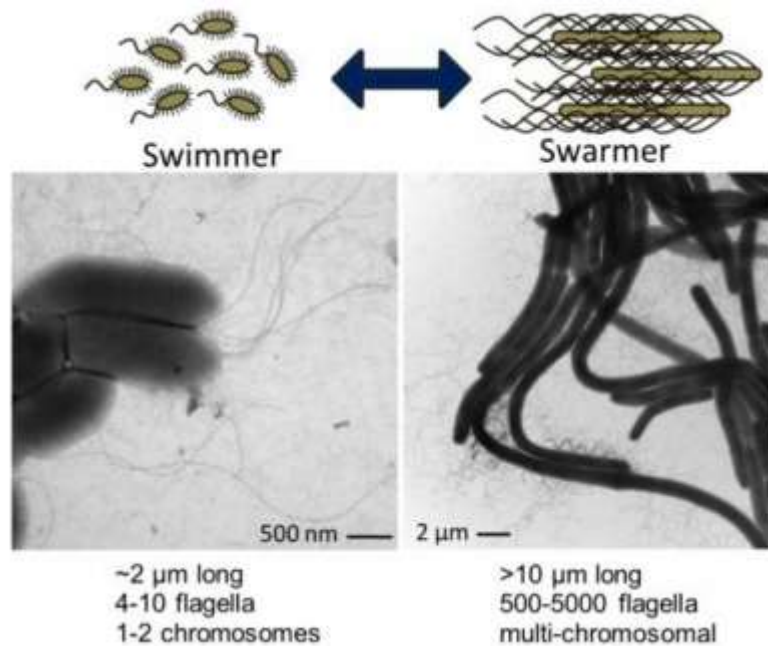


Figura 2 - *P. mirabilis* alterna entre as formas *swimming* e *swarming*. À esquerda é uma micrografia eletrônica de transmissão (MET) de células cultivadas em caldo, vegetativas exibindo flagelos peritríqueos. À direita é uma MET de células *swarm* diferenciadas, aonde os pacotes de flagelos são visíveis.

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

2.4.4 Urease

A urease do *P. mirabilis*, é uma metaloenzima, Ni²⁺ dependente, que é essencial para a colonização da bexiga e rins (MIRELES et al., 2015). O elevado nível desta enzima induz a rápida formação de cristais de cálcio (apatita) e fosfato de magnésio e amônia (estruvita), os quais ficam presos dentro dos polissacarídeos produzidos por células bacterianas formando biofilme cristalino em cateteres (JACOBSEN et al., 2011; KOSIKOWSKA et al., 2011; STICKLER et al., 2014). Os biofilmes cristalinos fornecem uma proteção do sistema imunológico e aos antimicrobianos (COKER et al., 2000). Estas estruturas também podem bloquear drenagem da urina dos ureteres, reter a urina na bexiga, potencialmente resultando em refluxo da urina infectada, e se o cateter não for trocado, poderá promover a progressão para pielonefrite, sepse e choque séptico (STICKLER, 2008; ARMBRUSTER et al., 2012).

Segundo Struble et al., (2009), a formação de cálculo de estruvita ocorre somente quando há aumento de produção de amônia e o elevado pH da urina diminui a solubilidade do fosfato. A produção de amônia e o aumento do pH só ocorre quando a urina está infectada com organismos produtores de urease, como *P. mirabilis*. Assim, a urease é considerada um dos fatores de virulência mais importantes, uma vez que leva a danos e necrose do tecido renal (AL-SAFAR, 2015; ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012; TORZEWSKA, 2003; BALDO et al., 2014).

2.4.5 Proteases

As proteases microbianas vêm se destacando como importantes fatores de virulência devido à ação direta sobre proteínas do hospedeiro, particularmente imunoglobulinas. O estudo em *P. mirabilis* tem sido focalizado na protease ZapA (mirabilisina), enzima capaz de degradar IgA e IgG (MICHELIM, 2008).

A ZapA de *P. mirabilis* é membro da família de metaloproteases bacterianas. Secretada no local da infecção, esta protease desempenha um papel fundamental no processo de infecção, que contribui para a destruição dos tecidos como também, afeta o sistema imune do paciente infectado. A inibição deste fator de virulência pode representar uma estratégia antimicrobiana de atenuar a virulência do patógeno infectante (CARSON, 2012).

2.4.6 Sideróforos

O ferro é necessário para a função de muitas proteínas e enzimas envolvidas em diversos processos biológicos, incluindo transporte de oxigênio, regulação de genes e fixação de nitrogênio. Em condições aeróbicas e pH neutro, o ferro existe na forma ferrosa insolúvel (Fe^{+3}), que pode ser tóxico após a interação com oxigênio (HIMPSL et al., 2010).

Sideróforos são peptídeos com altíssima afinidade por ferro produzidos por microrganismos onde eles desempenham a função de sequestrar e transportar Fe^{+3} até as células bacterianas (ANDREWS et al., 2003). São quelantes

de baixo peso molecular, secretados sob condições de deficiência de ferro (NEILANDS, 1995; EMERY, 1986; BENITE et al., 2002), ou seja, constituem mecanismos de extração de ferro do hospedeiro para o metabolismo bacteriano (VIEIRA et al., 2007).

O trato urinário é limitado em ferro e a aquisição de ferro por receptores da membrana externa é importante durante a ITU (ALTERI; MOBLEY, 2007; HAGAN; MOBLEY, 2009; SNYDER et al., 2004).

A análise de *P. mirabilis* HI4320 cultivada sob limitação de ferro identificou vários genes putativos significativamente regulados por este metal. Os genes putativos PMI0229-0239 codificam um sistema de sideróforo independente de peptídeos sintetase (NRPS) não ribossômico para produzir um novo sideróforo proteobactina porém, os genes PMI2596-2605 estão contidos na ilha de alta patogenicidade, originalmente descrita em *Yersinia pestis*, e codifica proteínas (HIMPSL et al., 2010).

Esta atividade mais significativa em *Proteus* é apresentada por α -cetoácidos resultantes da desaminação do triptofano fenilalanina (ácido indolpirúvico e ácido fenilpirúvico) e de outros α -cetoácidos que apesar de não formarem complexos estáveis com o ferro, possui conformação suficiente para quelar ferro na ausência de sideróforos clássicos (DRECHSEL et al., 1993).

Estes mecanismos de quelação são fundamentais na captação do íon ferro, que é essencial para o metabolismo da grande maioria das bactérias (EMODY et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2009; ZAPPA, 2015).

Múltiplas proteínas da membrana externa de *P. mirabilis* são reguladas positivamente tanto na urina humana como no meio limitador de ferro (SHAND et al., 1985) e três proteínas da membrana externa induzidas por inanição de ferro estão envolvidas na captação de heme em *P. mirabilis* 6515 (PICCINI et al., 1998). Um destes demonstrou funcionar como um receptor heme que contribui para a uropatogênese de *P. mirabilis* 6515 (LIMA et al., 2007).

2.4.7 Adesinas

A adesão às células hospedeiras é considerada como principal mecanismo de patogenicidade e o primeiro passo, a fim de estabelecer uma

infecção (ALAMURI et al., 2010). O sequenciamento e anotação do genoma da cepa *P. mirabilis* HI 4320 revelou que esta pode expressar uma gama diversificada de fímbrias responsáveis pela adesão as células renais e uroepiteliais (PEARSON, 2008; WRAY et al., 1986), possuindo um caso particular onde vários tipos de fímbrias podem ser expressos simultaneamente (MOBLEY; BELAS, 1995). Em *P. mirabilis* são descritas várias fímbrias: Fímbria não aglutinante (NAF), Fímbria *Proteus mirabilis* (PMF), Fímbria Temperatura Ambiente (ATF) e *Proteus*-like manose resistente (MR/P).

Entre estas, a fímbria MR/P é a mais estudada. Ela facilita a formação de biofilme e colonização da bexiga e rins, e são cruciais para a formação de biofilme em cateter (MIRELES et al., 2015).

Alguns estudos demonstram a participação da fímbria MR/P na adesão e formação do biofilme. Rocha et al (2007) mostram que uma mutação em *mrpA* diminui a aderência agregativa em células HEp-2 bem como na formação do biofilme. Mutantes de *P. mirabilis* que superexpressam a fímbria MR/P apresentam significativamente mais biofilme na presença de urina do que cepas que subexpressam ou mesmo a cepa selvagem, que formam níveis semelhantes de biofilmes (JANSEN et al., 2004; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

Outras fímbrias codificadas por *P. mirabilis* incluem PMFs (*P. mirabilis fimbriae*), são importantes para colonização da bexiga e do rim (MASSAD et al., 1994; ZUNINO et al., 2003) e NAFs (*non-agglutinating fimbriae*), que são capazes de se ligar às células uroepiteliais *in vitro*. PMFs foram descobertas nas tentativas de identificar os genes que codificam as fímbrias de UCA (BAHRANI et al., 1993). Ela pode ter um papel de curta duração, mas é essencial em causar ITU (SCHAFFER; PEARSON, 2015). UCA, também conhecida como fímbria não-aglutinante (NAF) foi identificada pela sua capacidade em se ligar a superfície de células uroepiteliais (COOK et al., 1995).

A subunidade estrutural principal desta fímbria denominada de UcaA é variável (KUAN et al., 2014), e essa variação permite a bactéria aderir em diferentes alvos (SCHAFFER; PEARSON, 2015). O termo NAF foi proposto como um nome alternativo para a UCA, a fim de distingui-la das outras fimbrias de *P. mirabilis* (TOLSON et al., 1995). Embora as sequências de aminoácidos fimbrias de UCA e NAF tenham mostrado ser as mesmas (LATTA et al., 1998), alguns autores

ainda empregam a denominação UCA, refletindo uma falta de consenso sobre a nomenclatura para esta adesina.

As fímbrias ATF (fímbria temperatura ambiente), cuja expressão ocorre a 25°C (MASSAD et al., 1994), não são importantes para a colonização do hospedeiro de *P. mirabilis*, pois não foi observada diferença estatística significativa entre a colonização da cepa mutante de ATF e da selvagem num modelo de infecção urinária (ZUNINO et al., 2000) porém, em caso de pacientes cateterizados são importantes na colonização do cateter.

Há também a Fímbria Manose Sensível (MS), a qual codifica uma subunidade proteica de 29KDa, responsável pela adesão íntima a receptores D-manose nas células (ABRAHAM et al., 1987). A fímbria MS é do tipo 1 e é encontrada em vários membros da Família Enterobacteriaceae, sendo composta principalmente por um único monômero de proteína o qual é codificada por um grupo de genes responsáveis pela subunidade estrutural, pela adesina, por proteínas acessórias envolvidas no transporte, montagem e fixação da fímbria (ABRAHAM et al., 1987). Em *Proteus* spp. é pouco citada e nem sempre está relacionada com ITU (OLD; ADEGBOLA, 1982; MOBLEY; CHIPPENDALE, 1990).

O pilus comum de *E. coli* (ECP) é uma estrutura adesiva produzida por todos os patótipos de *E. coli*, é codificada pelo operon cromossômico *ecpABCDE*, é composta por uma subunidade de pilina principal constituída de proteína com 21 kDa chamada EcpA, a qual não possui qualquer semelhança bioquímica com qualquer outra proteína de pilus conhecida e está presente em algumas espécies de Enterobactérias, como: *Citrobacter rodentium*, *Shigella boydii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* (RENDÓN et al., 2007; SALDAÑA et al., 2009; MARTÍNEZ-SANTOS et al., 2012).

2.5 Sensibilidade a Antimicrobianos de Uso Clínico

Devido à ação da urease e conseqüentemente formação de cálculos, *Proteus* spp. apresentam um mecanismo de evasão dos antimicrobianos, como por exemplo, incrustação nos cálculos, podendo mascarar a susceptibilidade assim, nem sempre as resistências observadas *in vivo* são as mesmas que *in vitro* (R'OZALKI et al., 1997).

Em indivíduos com ITU recorrente, que inclui cerca de 3% das mulheres, as crescentes taxas de resistência a antibióticos para terapias de primeira e de segunda linha pode tornar o tratamento de ITU desafiador. Na Turquia, o antibiótico de primeira linha para ITU, trimetoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX), foi amplamente utilizado no início de 1980. Até o início 1990, as taxas de resistência a TMP-SMX tinham aumentado acima de 50%. Na década seguinte a mudança para quinolonas para o tratamento de ITU apresentou uma taxa de resistência na Turquia em quase 30% (KARACA et al., 2005). Nos EUA e Canadá, aproximadamente 10-25% dos isolados de ITU não complicada são resistentes ao TMP-SMX, e na Espanha e Portugal a taxa de resistência chega a 35% (KARACA et al., 2005; GUPTA et al., 2001; ZHANEL et al., 2005).

Um trabalho realizado em Brasília no período de 2001 a 2005 teve como objetivo identificar os agentes etiológicos mais frequentes e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das bactérias isoladas de uroculturas de pacientes ambulatoriais atendidos no Hospital Universitário de Brasília (HUB). Foram analisadas 2.433 uroculturas positivas, onde *E. coli* foi a bactéria mais isolada (62,4%), seguida de *K. pneumoniae* (6,8%) e *P. mirabilis* (4,7%). *P. mirabilis* foi altamente sensível aos aminoglicosídeos e quinolonas (PIRES et al., 2007). Outro trabalho publicado no Jornal Brasileiro de Nefrologia em 2013, mostra que foram coletados amostras de janeiro a dezembro de 2010 de pacientes com ITU onde a prevalência foi *E. coli* (76,6%), seguido de *P. mirabilis* (10,3%) e *Staphylococcus saprophyticus* (4,1%) (LO et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S.H.; GOGUEN, J.D.; SUN, D.; KLEMM, P.; BEACHEY, E.H. Identification of two ancillary subunits of *Escherichia coli* type 1 fimbriae by using antibodies against synthetic oligopeptides of fim gene products. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 5530-5536, 1987.
- ALAMURI, P. et al. Adhesion, invasion, and agglutination mediated by two trimeric autotransporters in the human uropathogen *Proteus mirabilis*. **Infect Immun**, v. 78, n. 11, p. 4882-94, Nov 2010.
- ALAMURI, P.; MOBLEY, H. L. A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. **Mol Microbiol**, v. 68, n. 4, p. 997-1017, May 2008.
- ALLISON, C.; LAI, H. C.; HUGHES, C. Co-ordinate expression of virulence genes during *swarm*-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. **Mol Microbiol**, v. 6, n. 12, p. 1583-91, Jun 1992.
- ALTERI, J. C.; MOBLEY, H. L. T. Quantitative Profile of the Uropathogenic *Escherichia coli* Outer Membrane Proteome during Growth in Human Urine. **J. ASM**, v. 75, n. 6, p. 1272, Mar 2007.
- AL-Safar, M. A. The Role of Purified Urease from *Proteus mirabilis* PMS17 in Stones Formation. **J. Medical Sci. and Clin Res**, v. 3, n. 8, p. 7048-7057, Aug 2015.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiol Rev**, v. 27, n. 2-3, p. 215-37, Jun 2003.
- APOLINÁRIO, T. A. et al. Prevalência de infecção urinária e resistência a antimicrobianos em um grupo de gestantes. **Revista Científica da Faminas**, v. 10, n. 2, p. 55-72, mai-ago. 2014.

ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 743-54, Nov 2012.

BAHASHWAN, S. A.; SHAFEY, H. M. Antimicrobial resistance patterns of *Proteus* isolates from clinical specimens. **ESJ**, v. 9, p. 188-202. 2013.

BAHRANI, F. K. et al. *Proteus mirabilis* fimbriae: N-terminal amino acid sequence of a major fimbrial subunit and nucleotide sequences of the genes from two strains. **Infect Immun**, v. 61, n. 3, p. 884-91, Mar 1993.

BAHRANI, F. K.; MOBLEY, H. L. *Proteus mirabilis* MR/P fimbriae: molecular cloning, expression, and nucleotide sequence of the major fimbrial subunit gene. **J Bacteriol**, v. 175, n. 2, p. 457-64, Jan 1993.

BALDO, C.; PAULO, S.; ROCHA, D. Virulence factors of uropathogenic *Proteus mirabilis*. **Int. J. of Sci. and Tech. Res.**, v. 3, n. 11, 2014.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. de P.; MACHADO, B. da C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6b, p. 1155-1164, Dec 2002.

CALVO, J. M.; MATTHEWS, R. G. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. **Microbiol Rev**, v. 58, n. 3, p. 466-90, Sep 1994.

CARSON, L. et al. Comparison of the binding specificity of two bacterial metalloproteases, LasB of *Pseudomonas aeruginosa* and ZapA of *Proteus mirabilis*, using N-alpha mercaptoamide template-based inhibitor analogues. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 422, n. 2, p. 316-20, Jun 2012.

CHOW, A. W. et al. A nosocomial outbreak of infections due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colonization as a major reservoir. **J Infect Dis**, v. 139, n. 6, p. 621-7, Jun 1979.

COELHO, F.; SAKAE, T.M.; ROJAS, P. F. B. Prevalência de infecção do trato urinário e bacteriúria em gestantes da clínica ginecológica do Ambulatório Materno Infantil de Tubarão SC no ano de 2005. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v. 37, n. 3. 2008.

COKER, C. et al. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes Infect**, v. 2, n. 12, p. 1497-505, Oct 2000.

COOK, S. W. et al. Molecular cloning of *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adherence (uca) genes. **Infect Immun**, v. 63, n. 5, p. 2082-6, May 1995.

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

DUAN, Q. et al. Flagella and bacterial pathogenicity. **J Basic Microbiol**, v. 53, n. 1, p. 1-8, Jan 2013.

EMERY, T. Exchange of iron by gallium in siderophores. **Biochemistry**, v. 25, n. 16, p. 4629-33, Aug 1986.

EMODY, L.; KERÉNYI, M.; NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 22 Suppl 2, p. 29-33, Oct 2003.

FIHN, S. D. Clinical practice. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. **N Engl J Med**, v. 349, n. 3, p. 259-66, Jul 2003.

FLANNERY, E. L.; MODY, L.; MOBLEY, H. L. Identification of a modular pathogenicity island that is widespread among urease-producing uropathogens and shares features with a diverse group of mobile elements. **Infect Immun**, v. 77, n. 11, p. 4887-94, Nov 2009.

FLORES-MIRELES, A. L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 5, p. 269-84, May 2015.

FOXMAN, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. **Am J Med**, v. 113 Suppl 1A, p. 5S-13S, Jul 2002.

FOXMAN, B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. **Infect Dis Clin North Am**, v. 28, n. 1, p. 1-13, Mar 2014.

FRASER, G. M. et al. *Swarming*-coupled expression of the *Proteus mirabilis* *hpmBA* haemolysin operon. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 7, p. 2191-201, Jul 2002.

FREITAS, R. B.; RESENDE, J. A.; MENDONÇA, B. G.; ANTONIO, T.; FORTUNATO, R. S.; OLIVEIRA, M. A. C. INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO DE ORIGEM HOSPITALAR E COMUNITÁRIA: revisão dos principais micro-organismos causadores e perfil de susceptibilidade. **Revista Científica FAGOC-Saúde**, v. 1, n. 1, 2016.

GENAO, L.; BUHR, G. T. Urinary Tract Infections in Older Adults Residing in Long-Term Care Facilities. **Ann Longterm Care**, v. 20, n. 4, p. 33-38, Apr 2012.

GETLIFFE, K. A.; MULHALL, A. B. The encrustation of indwelling catheters. **British Journal of Urology**, v. 67, n. 4, p. 337-341, 1991.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil tratado de medicina interna**. 23. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 3458 p.

GUPTA, K.; HOOTON, T. M.; STAMM, W. E. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. **Ann Intern Med**, v. 135, n. 1, p. 41-50, Jul 2001.

HACKER, J.; HUGHES, C. Genetic analysis of bacterial haemolysin production. **Bull Inst Pasteur**. v.83, p. 149-165, 1985.

HAGAN, E. C.; MOBLEY, H. L. Haem acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic *Escherichia coli* for kidney infection. **Mol**

Microbiol, v. 71, n. 1, p. 79-91, Jan 2009.

HART, B. R.; BLUMENTHAL, R. M. Unexpected coregulator range for the global regulator Lrp of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **J Bacteriol**, v. 193, n. 5, p. 1054-64, Mar 2011.

HIMPSON, S. D. et al. Identification of virulence determinants in uropathogenic *Proteus mirabilis* using signature-tagged mutagenesis. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 9, p. 1068-78, Sep 2008.

HIMPSON, S. D. et al. Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. **Mol Microbiol**, v. 78, n. 1, p. 138-57, Oct 2010.

HOOTON, T. M. Pathogenesis of urinary tract infections: an update. **J Antimicrob Chemother**, v. 46 Suppl A, p. 1-7, Aug 2000.

HOOTON, T. M.; STAMM, W. E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. **Infect Dis Clin North Am**, v. 11, n. 3, p. 551-81, Sep 1997.

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

JACOBSEN, S. M. et al. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, n. 1, p. 26-59, Jan 2008.

JANSEN, A. M. et al. Mannose-resistant *Proteus-like fimbriae* are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. **Infect Immun**, v. 72, n. 12, p. 7294-305, Dec 2004.

JONES, B. V. et al. Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of *swarming* in catheter-associated urinary tract infection. **Infect Immun**, v. 72, n. 7, p. 3941-50, Jul 2004.

KARACA, Y. et al. Co-trimoxazole and quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections over the last 10 years. **Int J Antimicrob Agents**, v. 26, n. 1, p. 75-7, Jul 2005.

KLUSKENS, L. D. et al. Molecular characterization of fervidolysin, a subtilisin-like serine protease from the thermophilic bacterium *Fervidobacterium pennivorans*. **Extremophiles**, v. 6, n. 3, p. 185-94, Jun 2002.

KOSIKOWSKA, P.; BERLICKI, Ł. Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review. **Expert Opin Ther Pat**, v. 21, n. 6, p. 945-57, Jun 2011.

KUAN, L. et al. Characterization of 17 chaperone-usher fimbriae encoded by *Proteus mirabilis* reveals strong conservation. **J Med Microbiol**, v. 63, n. Pt 7, p. 911-22, Jul 2014.

KUNIN, C. M. Urinary tract infections: detection, prevention and management. 5th ed. **Baltimore**: Williams and Wilkins, 419 p. 1997.

LATTA, R.K.; SCHUR, M.J.; TOLSON, D.L.; ALTMAN, E. The effect of growth conditions on in vitro adherence, invasion, and NAF expression by *Proteus mirabilis* 7570. **Can. J. Microbiol.**, 44, p. 896-904, 1998.

LI, X. et al. Identification of MrpI as the sole recombinase that regulates the phase variation of MR/P fimbria, a bladder colonization factor of uropathogenic *Proteus mirabilis*. **Mol Microbiol**, v. 45, n. 3, p. 865-74, Aug 2002.

LIMA, A. et al. An iron-regulated outer-membrane protein of *Proteus mirabilis* is a haem receptor that plays an important role in urinary tract infection and in in vivo growth. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 12, p. 1600-7, Dec 2007.

LO, D.S. et al. Community-acquired urinary tract infection: age and gender-dependent etiology. **J Bras Nefrol**, v. 25, p. 93–98. 2013.

LOPES, H. V.; TAVARES, W. Diagnóstico das infecções do trato urinário. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 51, n. 6, p. 306-308, Dec 2005.

LUKOMSKI, S. et al. Cell-free and cell-bound hemolytic activities of *Proteus penneri* determined by different Hly determinants. **Can J Microbiol**, v. 37, n. 6, p. 419-24, Jun 1991.

MANOS, J.; BELAS, R. The genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. In: **The prokaryotes**. Springer New York. p. 245-269. 2006.

MARTÍNEZ-SANTOS, V. I. et al. Transcriptional regulation of the *ecp* operon by *EcpR*, IHF, and H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 194, n. 18, p. 5020-33, Sep 2012.

MASSAD, G. et al. *Proteus mirabilis* fimbriae: construction of an isogenic *pmfA* mutant and analysis of virulence in a CBA mouse model of ascending urinary tract infection. **Infect Immun**, v. 62, n. 2, p. 536-42, Feb 1994.

MASSAD, G.; MOBLEY, H. L. Genetic organization and complete sequence of the *Proteus mirabilis* *pmf* fimbrial operon. **Gene**, v. 150, n. 1, p. 101-4, Dec 1994.

MCCUSKER, M. E.; PÉRISSÉ, A. R.; ROGHMANN, M. C. Severity-of-illness markers as predictors of nosocomial infection in adult intensive care unit patients. **Am J Infect Control**, v. 30, n. 3, p. 139-44, May 2002.

MELO, R. O. de. Formação de biofilme em cateter urinário por *Proteus mirabilis* uropatogênico. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia)**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

MENIN, V. T.; GRAZZIOTIN, N. A. Infecções do Trato Urinário Diagnosticadas no Laboratório Universitário da URI - Campus de Erechim/RS. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 42, n.4, p. 307-10. 2010.

MICHELIM, L. et al. Comparison of PCR-based molecular markers for the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates. **Braz J Infect Dis**, v. 12, n. 5, p. 423-9, Oct 2008.

MOBLEY, H.L.T. Virulence of the two primary uropathogens. **ASM News**, v. 66, p. 403- 410, 2000.

MOBLEY, H. L.; BELAS, R. *Swarming* and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. **Trends Microbiol**, v. 3, n. 7, p. 280-4, Jul 1995.

MOBLEY, H. L.; CHIPPENDALE, G. R. Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. **J Infect Dis**, v. 161, n. 3, p. 525-30, Mar 1990.

MOBLEY, H. L.; WARREN, J. W. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. **J Clin Microbiol**, v. 25, n. 11, p. 2216-7, Nov 1987.

MORGAN, D. R. et al. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. **Infect Immun**, v. 50, n. 1, p. 62-5, Oct 1985.

NEILANDS, J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **J Biol Chem**, v. 270, n. 45, p. 26723-6, Nov 1995.

NIELUBOWICZ, G. R.; MOBLEY, H. L. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. **Nat Rev Urol**, v. 7, n. 8, p. 430-41, Aug 2010.

O'HARA, C. M.; BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 4, p. 534-46, Oct 2000.

OLD, D.; ADEGBOLA, R. Hemagglutinins and fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. **J. Med. Microbiol.**, 15, p. 551-564, 1982.

PÄRN, T.; MÄKELÄ, M.; LYYTIKÄINEN, O. Urinary tract infections and antimicrobial use among Finnish home care clients, April-September 2014. **Am J Infect Control**, v. 44, n. 11, p. 1390-1392, Nov 2016.

PEARSON, M. M. et al. Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. **J Bacteriol**, v. 190, n. 11, p. 4027-37, Jun 2008.

PENNER, J.L. The genera *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*, In: A. Balows, H. G. Truper, W. Harder, and K. H. Schleifer(ed.). **The prokaryotes**, vol.3. p. 2849–2853. 1992.

PEWITT, E. B.; SCHAEFFER, A. J. Urinary tract infection in urology, including acute and chronic prostatitis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 11, n. 3, p. 623-46, Sep 1997.

PICCINI, C. D.; BARBE´, F. M.; LEGNANI-FAJARDO, C. L. Identification of iron-regulated outer membrane proteins in uropathogenic *Proteus mirabilis* and its relationship with heme uptake. **FEMS Microbiol Lett**, v. 166, p. 243–248. 1998.

PIRES, M. C. et al. [Prevalence and bacterial susceptibility of community acquired urinary tract infection in University Hospital of Brasília, 2001 to 2005]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 6, p. 643-7, 2007 Nov-Dec 2007.

RENDÓN, M. A. et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 25, p. 10637-42, Jun 2007.

ROCHA, S. P. et al. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 319-26, Nov 2007.

RONALD, A. R.; HARDING, G. K. Complicated urinary tract infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 11, n. 3, p. 583-92, Sep 1997.

RUMMUKAINEN, M. L. et al. Assessing prevalence of antimicrobial use and infections using the minimal data set in Finnish long-term care facilities. **Am J Infect Control**, v. 41, n. 4, p. e35-7, Apr 2013.

RÓZALSKI, A.; SIDORCZYK, Z.; KOTEŁKO, K. Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 1, p. 65-89, Mar 1997.

SALDAÑA, Z. et al. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. **J Bacteriol**, v. 191, n. 11, p. 3451-61, Jun 2009.

SATO, A. F.; SVIDZINSKI, A. E.; CONSOLARO MEL, BOER, C. G. Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram positivos. **J Bras de Patol e Medic Laboratorial**. v. 41, n. 6. 2005.

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 5, Oct 2015.

SHAND, G. H.; ANWAR, H.; KADURUGAMUYA, J.; BROWN, M. R. W.; SILVERMAN, S. H.; MELLING, J. In vivo evidence that bacteria in urinary tract infection grow under iron-restricted conditions. **Infect Immun**, v. 48, p. 35–39, 1985.

SIQUEIRA, A. K. et al. Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. **Res Vet Sci**, v. 86, n. 2, p. 206-10, Apr 2009.

SNYDER, J. A. et al. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. **Infect Immun**, v. 72, n. 11, p. 6373-81, Nov 2004.

STICKLER, D. J. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. **Nat Clin Pract Urol**, v. 5, n. 11, p. 598-608, Nov 2008.

_____. Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. **J Intern Med**, v. 276, n. 2, p. 120-9, Aug 2014.

STICKLER, D. J.; MORGAN, S. D. Observations on the development of the crystalline bacterial biofilms that encrust and block Foley catheters. **J Hosp Infect**, v. 69, n. 4, p. 350-60, Aug 2008.

STRUBLE, K.; BRONZE, M. S.; JACKSON, R. L.; GONZALEZ, G. *Proteus* infections. **Med Infect Diseases**, 2009.

TAN, I. K.; GAJRA, B. Plasma and urine amino acid profiles in a healthy adult population of Singapore. **Ann Acad Med Singapore**, v. 35, n. 7, p. 468-75, Jul 2006.

TOLSON, D.L.; BARRIGAR, D.L.;MCLEAN, R.J.C.; ALTMAN, E. Expression of a nonagglutinating fimbria by *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.*, 63, p. 1127-1129, 1995.

TORZEWSKA, A.; STACZEK, P.; RÓZALSKI, A. Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of *Proteus* endotoxin polysaccharides. **J Med Microbiol**, v. 52, n. Pt 6, p. 471-7, Jun 2003.

VALIQUETTE, L. Urinary tract infections in women. **Can J Urol**, v. 8 Suppl 1, p. 6-12, Jun 2001.

VIEIRA, J. M. D. S.; SARAIVA, R. M. C.; MENDONÇA, L. C. D. V.; FERNANDES, V. O.; PINTO, M. R. D. C.; VIEIRA, A. B. R. Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA. **Rev. Bras. Anal. Clin**, v. 39, n. 2, p. 119-121, 2007.

VIEIRA-NETO, O. M. Infecção do Trato Urinário. **Rev. Med. Ribeirão Preto**, v. 36, p. 365-369, abr./dez. 2003.

VINCENT, J. L. Nosocomial infections in adult intensive-care units. **Lancet**, v. 361, n. 9374, p. 2068-77, Jun 2003.

WAGENLEHNER, F. M. et al. Incidence of nosocomial urinary tract infections on a surgical intensive care unit and implications for management. **Int J Antimicrob Agents**, v. 28 Suppl 1, p. S86-90, Aug 2006.

WARREN, J. W. Catheter-associated urinary tract infections. **Infect Dis Clin North Am**, v. 11, n. 3, p. 609-22, Sep 1997.

WILLIAMS, F. D.; SCHWARZHOFF, R. H. Nature of the *swarming* phenomenon in *Proteus*. **Annu Rev Microbiol**, v. 32, p. 101-22, 1978.

WRAY, S. K. et al. Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesin from a uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. **Infect Immun**, v. 54, n. 1, p. 43-9, Oct 1986.

ZAPPA, V. Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos, concentração inibitória mínima e beta-lactamases de espectro estendido em linhagens de *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. **Tese (doutorado)**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2015.

ZHANEL, G. G. et al. Antibiotic resistance in outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA). **Int J Antimicrob Agents**, v. 26, n. 5, p. 380-8, Nov 2005.

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

ZUNINO, P. et al. New aspects of the role of MR/P fimbriae in *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 31, n. 2, p. 113-20, Aug 2001.

_____. *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 11, p. 3231-7, Nov 2003.

ARTIGO CIENTÍFICO

CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Proteus mirabilis* UROPATOGÊNICO

WALDRICH, T. L.1; PELAYO, J.S.1; ROCHA, S.P.D. 1

1 – Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

A infecção do trato urinário (ITU) está entre as infecções mais prevalentes e responde por grande parte dos processos infecciosos, comunitários e hospitalares. *Proteus mirabilis* é um dos principais agentes causais de ITU. As infecções causadas por esta bactéria são caracterizadas como de longa permanência e difícil tratamento, podendo muitas vezes levar ao óbito. Com o intuito de contribuir para o conhecimento dos principais fatores de virulência deste importante patógeno, no presente estudo, foram analisadas 47 cepas de *P. mirabilis* uropatogênico. As análises englobaram a pesquisa de genes de virulência através da PCR e as características fenotípicas dos fatores de virulência, como formação de cristais e biofilme, citotoxicidade e a verificação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de uso clínico. Os resultados mostram que *P. mirabilis* uropatogênico apresenta diversos genes de virulência. Foram encontrados 56,25% *hpmA*, 52,08% *hpmB*, 68,75% *ptA*, 0% *hlyA*, 100% *ureA*, 6,25% *zapA*, 14,58% *mrpA*, 70,83% *fimH*, 77,08% *pmfA*, 85,41% *ucaA*, 54,16% *ireA* e 0% *ecpA*. Todas as cepas apresentaram capacidade em formar cristais *in vitro*, 90% destas formaram biofilme e apresentaram atividade citotóxica. Portanto, a análise molecular dos fatores de virulência, teste de formação de cristais, biofilme e sensibilidade a antimicrobianos são importantes para a identificação desta bactéria, auxiliando no diagnóstico e devido tratamento.

Palavras-chave: *Proteus mirabilis*. Infecção urinária. Fatores de virulência.

ABSTRACT

Urinary tract infection (UTI), is among the most prevalent infections and accounts for much of the infectious, community and hospital processes. *Proteus mirabilis* is one of the main causative agents of UTI. Infections caused by this bacillus are characterized as long-term and difficult to treat and can often lead to death. In order to contribute to the understanding of the main virulence factors of this important human pathogen, in the present study, we analyzed 47 samples of uropathogenic *P. mirabilis*. Preliminary analyzes encompassed search of virulence factors by PCR, the phenotypic characteristics of virulence factors such as crystal formation and biofilm and checking the sensitivity profile antimicrobial clinical use. The results showing that uropathogenic *P. mirabilis* presents diverse virulence genes. Were found 56,25% *hpmA*, 52,08% *hpmB*, 68,75% *ptA*, 0% *hlyA*, 100% *ureA*, 6,25% *zapA*, 14,58% *mrpA*, 70,83% *fimH*, 77,08% *pmfA*, 85,41% *ucaA*, 54,16% *ireA* e 0% *ecpA*. All were able to form crystals in vitro, 90% of the samples formed biofilm and presented cytotoxic activity. Therefore, the molecular analysis of virulence factors, crystal formation test, biofilm and antimicrobial susceptibility are important for identification of the bacteria, aiding in the diagnosis and proper treatment.

Keywords: *Proteus mirabilis*. Urinary tract infection. Virulence factors.

INTRODUÇÃO

Anualmente, ocorrem cerca de 150 milhões de caso de ITU sintomáticas ao redor do mundo, dos quais aproximadamente 2% dos pacientes apresentam infecções complicadas. Sua incidência varia entre os gêneros de acordo com a idade, porém, na vida adulta a infecção do trato urinário se eleva e se mantém em predomínio no sexo feminino, principalmente a partir do início da vida sexualmente ativa (HACHUL et al., 2015). Portanto, indivíduos com alto risco de ITU incluem neonatos, mulheres sexualmente ativas e homens e mulheres que estejam utilizando cateter uretral (COKER et al., 2000).

Embora *E. coli* seja a bactéria responsável pela maioria dos casos, as infecções causadas por *Proteus mirabilis* são significantes devido aos seus fatores de virulência (JACOBSEN et al., 2008; O'HARA et al., 2000). *P. mirabilis* é

um importante causador de ITU, apresentam uma taxa de degradação de ureia de 6 a 30 vezes mais rápida quando comparada com outros microrganismos produtores de urease (JONES; MOBLEY, 1987). Este microrganismo é capaz induzir a formação de cristais, sendo que esta formação está associada à presença de bactérias que produzem urease, uma enzima capaz de hidrolisar a ureia presente na urina, produzindo íons de amônia e carbonato, e ainda alcalinizar a urina (NICOLLE, 2001; STICKLER, 2008). Segundo Struble et al., (2009) os cálculos são compostos de uma combinação de fosfato amoníaco magnésiano (estruvita) e carbonato de cálcio (apatita).

P. mirabilis frequentemente forma biofilmes em cateteres urinários devido à deposição de cristais nesses biofilmes, pode ocorrer o bloqueio dos cateteres urinários e levar a retenção de urina na bexiga e episódios de bacteriúria. Esses episódios de bacteriúria possibilitam a ocorrência de febre, sepse e outros sinais de cistite (STICKLER; ZIMAKOFF, 1994). A incrustação nos cateteres pode causar traumas na mucosa da bexiga e da uretra após a remoção (STICKLER; ZIMAKOFF, 1994, MELO, 2010).

Os fatores de virulência de *P. mirabilis* são fundamentais na uropatogênese desta bactéria e também, não há muitos estudos que caracterizam a virulência dos isolados clínicos. O objetivo do presente estudo foi caracterizar genotípica e fenotipicamente os fatores de virulência de cepas de *P. mirabilis* uropatogênico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Foram analisadas 47 cepas de *P. mirabilis* uropatogênicos pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Estadual de Londrina. Todas as cepas foram isoladas de urina de pacientes com ITU internados no Hospital Universitário da UEL, no período Janeiro a Dezembro do ano de 2009 e identificadas por provas bioquímicas (indol, citrato, H₂S, ureia, fenil, lisina, arginina, ornitina, motilidade e gás) e em seguida, mantidas em caldo infusão cérebro coração

(BHI) com glicerol e armazenadas em -80°C . Como controle positivo nos diversos experimentos, foram utilizadas as bactérias padrões *P. mirabilis* ATCC 7002 e *P. mirabilis* HI 4320 (PEARSON et al., 2008).

Obtenção do DNA bacteriano

O DNA bacteriano foi extraído por fervura e congelamento, seguindo as recomendações de Blanco et al., (2004). Assim, 500 μL da cultura em caldo LB foi transferida para um microtubo esterilizado de 1,5mL e centrifugado a 10.000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso com 300 μL de água ultrapura estéril e levado à fervura (100°C) por 10 minutos. Após a retirada do material da fervura, foi dado choque térmico em banho com gelo (0°C) por 3 minutos. A amostra passou por nova centrifugação a 10000xg por 5 minutos, retirando-se o sobrenadante, o qual representa o lisado bacteriano, denominado de DNA, que foi utilizado para as reações de PCR.

Pesquisa de Genes de Virulência Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A fim de avaliar a presença de cada fator de virulência, a reação enzimática foi efetuada no termociclador contendo: 0,5 μL do sobrenadante de lisado bacteriano, dNTPs - 0.2 mM (Invitrogen®), MgCl_2 - 2 mM (Invitrogen®), tampão 10X (Invitrogen®), iniciador - 20 pmol (Invitrogen®) e *Taq* DNA polimerase - 1.5 U (Invitrogen®). A tabela 1 mostra todos os genes pesquisados.

Tabela 1 - Gene alvo, sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do fragmento e temperatura de hibridização.

Gene	Sequência do oligonucleotídeo iniciador (5'→3')	Fragmento (pb)	Temperatura	Referência
<i>hpmA</i>	(F)GTTGAGGGGCGTTATCAAGAGTC (R)GATACTGTTTTGCCCTTTGTGC	709	55°C	Cestari et al. (2013)

<i>hpmB</i>	(F) CAGTGGATTAAGCGCAAATG (R) CCTTCAATACGTTCAACAAACC	422	55 °C	Cestari et al. (2013)
<i>hlyA</i>	(F) AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT (R) ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA	1177	63 °C	Johson et al. (2000)
<i>ureA</i>	(F)GCTTTTTACTGCAGGCCTTGTT (R)AATTTGGTGCCATCGGGGAA	240	60 °C	Este estudo
<i>mrpA</i>	(F) GAGCCATTCAATTAGGAATAATCCA (R) AGCTCTGTA CTTCTGTACAGA	648	58 °C	Rocha et al. (2007)
<i>fimH</i>	(F) TGCAGAACGGATAAGCCG GG (R) GCAGTCACCTGCCCTCCGTGA	508	63 °C	Johson et al. (2000)
<i>pmfA</i>	(F) CAAATTAATCTAGAACCACTC (R) ATTATAGAGGATCCCTTGAAGGTA	617	54 °C	Zunino et al. (2003)
<i>ucaA</i>	(F) GCTTTTACATCCCCAGCGGT (R) GCTGCATTTGCTGGCTCATC	476	60 °C	Este estudo
<i>ecpA</i>	(F)CGCGGATCCATGAAAAAAAAAGGTTCTGGC (R)CGCGAATTCTAACTGGTCCAGGTCGCGTCG	588	55 °C	Rendon et al. (2011)
<i>ireA</i>	(F) ACTACGATAACGAGCGCCAG (R) GCCCTAACTGGGGGAATACG	681	60 °C	Pearson et al. (2008)

F: senso, R: anti-senso.

Eletoforese em gel de agarose

Depois de amplificado, o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% a 2%, dependendo do tamanho do fragmento amplificado, corado com o intercalante de DNA, SYBR® SAFE (Invitrogen), submerso em tampão TBE (89mM Tris base; 89mM Ácido Bórico; 2mM EDTA; pH 8,3). As amostras e um padrão de marcador molecular (1Kb Ladder – Invitrogen) foram aplicados em tampão de amostra para DNA (Ficoll 400 2,5%; Azul de Bromofenol 0,025%; Xileno cianol FF 0,025%). O sistema foi submetido a uma diferença de potencial (70V) com amperagem constante por 50 minutos. Após a eletroforese, os produtos dos genes foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta ECX-20.M (Vilbert Loumart).

Formação de cristais

A detecção da formação de cristais de apatita ou estruvita em ágar urina foi realizada de acordo com Silva et al. 2002. As urinas humanas de quatro voluntários saudáveis, duas masculinas e duas femininas, foram coletadas em frascos estéreis. O pool destas urinas foi formado por quantidades volumétricas iguais das respectivas urinas. O pool foi centrifugado a 5000xg por 10min a 4°C e então filtrado em filtro de seringa, com membrana em PVDF (Fluoreto de polivinilideno) Neobio® com 0,22 µm de diâmetro. O ágar bacteriológico foi preparado separadamente, autoclavado e adicionado ao pool de urina estéril para uma concentração final de 1%. As amostras bacterianas foram cultivadas em caldo de triptona soja (TSB) a 37°C por 18h. Em seguida, foi realizada a técnica de *pour plate*, onde 100µL do cultivo bacteriano foi misturado com o ágar urina e então as placas foram incubadas a 37°C por 72h.

Biofilme

O teste para verificar a formação do biofilme bacteriano foi realizado em placas de poliestireno de acordo com a metodologia descrita por Rocha et al. (2007).

Bactérias isoladas foram cultivadas em caldo LB por 18h com temperatura de 37°C depois, diluídas na concentração de 1:10 em 200ul de pool de urina humana estéril, em placas de poliestireno de 96 poços e incubadas durante 24h a 37°C. Cepas padrões *P. mirabilis* HI 4320 e ATCC 7002 foram usadas como controle positivo e o pool de urina humana estéril como controle negativo.

Após a incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado três vezes com 200ul de água destilada estéril. As microplacas foram secas ao ar e as bactérias aderidas, coradas com 200ul de cristal violeta aquoso a 0,1% durante 15 min. Depois de três lavagens com água destilada estéril, foi adicionado 200ul de dimetilsulfóxido (DMSO).

Destes 200ul, 100ul de solução de cristal violeta e DMSO foram transferidos para uma nova placa de poliestireno e a densidade óptica (DO) de cada cavidade foi medida a 595nm. Os testes foram realizados em triplicata.

Ensaio de citotoxicidade em células Vero

Todas as cepas foram avaliadas quanto à capacidade de produzir efeito citotóxico em células Vero conforme descrito por Beutin et al., (1989), com modificações. Os isolados bacterianos foram cultivados em 3mL de caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C por 18h sob agitação a 180rpm. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 13000xg por 10min. Os sobrenadantes foram coletados e filtrados em filtro de seringa, com membrana em PVDF (Fluoreto de polivinilideno) com 0,22 µm de diâmetro.

Placas de 96 orifícios foram semeadas com aproximadamente 2×10^5 células Vero/mL em meio de cultivo DMEM, contendo 10% de SFB e antibióticos (penicilina 1000 U/ml e estreptomicina 1 mg/ml) e incubadas por 24h a 37°C e 5% de CO₂. Os sobrenadantes filtrados foram adicionados aos orifícios na diluição de 1:10 em duplicatas e, em seguida, as placas foram incubadas por 72h a 37°C e 5% de CO₂. Células incubadas apenas com o DMEM, sem toxinas, foram utilizadas como controle.

A citotoxicidade dos isolados foi quantificada após a análise da atividade metabólica das células Vero pelo ensaio do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), de acordo como Murakami et al., (2000). Após a leitura por absorvância em espectrofotometria a 550nm em leitor de ELISA, o percentual de citotoxicidade foi determinado pela fórmula $1 - (A_{amostra} / A_{controle}) \times 100$. Um isolado foi considerado altamente citotóxico quando atingido um percentual de 50% ou mais de morte celular quando comparado ao controle.

Sensibilidade a antimicrobianos

Este ensaio foi realizada segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2015), empregando os antimicrobianos da marca Oxoid™

preconizados pelo: Ácido Nalidíxico 30µg (NAL), Amoxicilina + Ácido Clavulânico 30µg (AMC), Cefalotina 30µg (KF), Cefoxitina 30µg (FOX), Cefotaxima 30µg (CTX), Ceftazidima 30µg (CAZ), Aztreonam 30µg (ATM), Cefepime 30µg (FEP), Ertapenem 10µg (ETP), Meropenem 10µg (MER), Gentamicina 10µg (GEN), Amicacina 30µg (AMI), Ciprofloxacina 5µg (CIP), Levofloxacina 5µg (LEV), Sulfametoxazol+Trimetoprim 25µg (SXT), Norfloxacina 10µg (NOR).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do software R Core Team (2015) sendo que os resultados foram analisados e considerados significativos quando o valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização genotípica foi realizada através da PCR. Foi investigada a presença dos seguintes genes de virulência - *hpmA*, *hpmB*, *ptA*, *hlyA*, *ureA*, *zapA*, *mrpA*, *fimH*, *pmfA*, *ucaA*, *ecpA* e *ireA* em quarenta e sete amostras de *P. mirabilis* uropatogênico conforme verificado na tabela 02. Foram encontrados 56,25% (27 isolados) *hpmA*, 56,25% (27 isolados) *hpmB*, 68,75% (33 isolados) *ptA*, 0% *hlyA*, 100% (47 isolados) *ureA*, 6,25% (3 isolados) *zapA*, 14,58% (7 isolados) *mrpA*, 70,83% (34 isolados) *fimH*, 77,08% (37 isolados), *pmfA*, 85,41% (41 isolados) *ucaA*, 54,16% (26 isolados) *ireA* e 0% *ecpA*.

Tabela 02 - Amostras e seus respectivos fatores de virulência verificados através da PCR.

Nº	AMOSTRA	<i>hpmA</i>	<i>hpmB</i>	<i>ptA</i>	<i>hlyA</i>	<i>ureA</i>	<i>zapA</i>	<i>mrpA</i>	<i>fimH</i>	<i>pmfA</i>	<i>ucaA</i>	<i>ecpA</i>	<i>ireA</i>
1	116 HU	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
2	50 HU	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
3	102 HU	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
4	112 HU	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
5	33 HU	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

6	115 HU	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
7	30 HU	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
8	29 HU	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
9	41 HU	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
10	32 HU	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
11	22 HU	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
12	40 HU	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
13	52 HU	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
14	113 HU	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
15	48 HU	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
16	27 HU	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
17	5 HU	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
18	54 HU	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
19	16 HU	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
20	31 HU	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
21	39 HU	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
22	7 HU	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
23	36 HU	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
24	101 HU	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
25	38 HU	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
26	15 HU	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
27	73 HU	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
28	49 HU	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
29	104 HU	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
30	45 HU	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
31	62 HU	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
32	86 HU	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
33	18 HU	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
34	64 HU	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
35	11 HU	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
36	103 HU	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
37	28 HU	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
38	53 HU	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
39	9 HU	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+

40	8 HU	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
41	24 HU	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
42	20 HU	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
43	21 HU	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
44	14 HU	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
45	34 HU	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-
46	26 HU	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
47	43 HU	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-

Legenda: Presente (+), Ausente (-).

A hemolisina facilita a propagação de bactérias dentro do rim e o desenvolvimento de pielonefrite durante ITUs (MOBLEY; CHIPPENDALE, 1990), uma vez que a produção dessa proteína tem sido correlacionada com a citotoxicidade em células Vero (PEERBOOMS et al., 1984; SWIHART; WELCH, 1990).

Koronakis et al., (1987) e Welch (1987) relataram dois tipos de atividade hemolítica em *P. mirabilis*, uma associada à célula (HpmA) sendo que a mesma é codificada por dois genes (*hpmA* e *hpmB*) e outra extracelular (HlyA).

A alfa-hemolisina cálcio independente (HlyA) é encontrada no sobrenadante de alguns isolados de *Proteus* spp., principalmente em *P. vulgaris*. A HlyA de *Proteus* spp., está relacionada com HlyA de *E. coli* e a produção da hemolisina HpmA é mais comum em *Proteus* spp. do que HlyA (SENIOR; HUGHES, 1987; SWIHART; WELCH, 1990).

Neste trabalho foram encontrados 56,25% (27 isolados) das amostras possuíram o gene *hpmA*, 56,25% (27 isolados) possuíram o gene *hpmB* e nenhuma amostra possuiu o gene *hlyA*. Sênior e Hughes (1987) verificaram que 94% das cepas de *P. mirabilis* produziram fator hemolítico associado à célula e cálcio-independente, característica da hemolisina HpmA. Swihard e Welch (1990) descreveram que HpmA é a hemolisina mais comum encontrada em isolados de *P. mirabilis*. Silva et al., (2003) fez um estudo com 35 cepas onde 100% apresentaram atividade hemolítica em hemácias de carneiro. Cestari et al., (2011) verificaram através da PCR e sequenciamento, que 211 isolados (97,15%) apresentaram os genes *hpmA* e *hpmB* e não foi encontrado o gene *hlyA*.

A toxina PtA é uma toxina que se autotransporta, medeia a agregação de célula-célula e também é capaz de lisar células renais e da bexiga

(FLANNERY et al., 2009). Neste trabalho, foram encontrados 68,75% (33 isolados) com o gene *ptA*, indicando alta prevalência nas amostras estudadas.

Alamuri et al., (2009) investigou os papéis das citotoxinas, a hemolisina HpmA e a Pta, associada à superfície. Foi realizada a análise de mutantes em um modelo de ratos com ITU ascendente. A inativação de *pta*, mas não a inativação de *hpmA*, resultou em diminuições significativas nas cargas bacterianas do mutante nos rins e no baço em comparação com as cargas bacterianas do tipo selvagem. Estes resultados indicaram que as atividades de HpmA e Pta são independentes uma da outra, mas aditivas, uma vez que contribuíram para a citotoxicidade (ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012). Confirmando o que foi encontrado neste trabalho, que nem todas as amostras que apresentaram o gene *hpmA*, também possuem o gene *ptA*. Porém, a presença desses genes foi confirmada em uma porcentagem bem próxima uma da outra.

Há evidências de que a hemolisina aumenta a virulência em infecções de *P. mirabilis*, uma vez que a produção dessa proteína tem sido correlacionada com a citotoxicidade em célula Vero (PEERBOOMS et al., 1984; SWIHART; WELCH, 1990). Silva et al., (2003) realizaram um estudo com 35 cepas de *P. mirabilis*, quando testada em célula Vero, após 3h de incubação foi observado efeito citopático e após 6h lise total das células.

Das 47 amostras analisadas nesta pesquisa, em 100% foi observado efeito citotóxico em células Vero (Figura 01). Um isolado é considerado altamente citotóxico quando atinge um percentual de 50% ou mais de morte celular quando comparado ao controle (MURAKAMI et al., 2000).

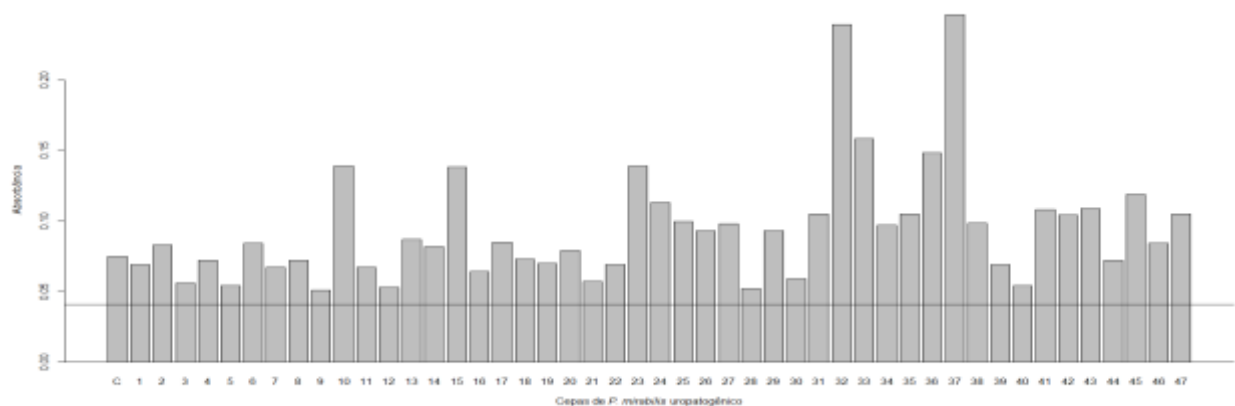


Figura 01 - Densidade ótica referente à citotoxicidade em células Vero das 47 cepas de *P. mirabilis*.

Quanto a formação de cristais, todas as amostras formaram quantidades representativas de cristais apatita e estruvita. Em média, cada cepa formou 27 cristais de apatita e 24 cristais de estruvita (Figura 2). Estes cristais podem proteger as bactérias contra antibióticos, anticorpos e inibidores de urease além de poder causar obstrução de cateteres de demora (SILVA et al., 2002). Nossos resultados confirmam o que foi citado por outros autores, relacionando *P. mirabilis* como sendo a bactéria mais isolada (cerca de 70%) com a formação de cálculos urinários (MOHAMMED et al., 2016; TORZEWSKA et al., 2014; RAMPURE et al., 2013), sendo uma das razões para a recorrência da doença pela capacidade de invadir as células uroepiteliais, persistirem nas células hospedeiras e servirem como reservatórios potenciais para infecção (TORZEWSKA et al., 2014).

Esta formação de cálculos está diretamente relacionada com a enzima *ureA*, onde neste trabalho foi confirmada em 100% das cepas. A hidrólise da ureia em CO₂ e amônia no trato urinário altera o pH da urina, causando a precipitação de íons, favorecendo a formação de cálculos de cristais de estruvita e apatita, contendo fosfato de cálcio e magnésio (MURRAY et al., 2007), contribuindo significativamente para a virulência.

Já a enzima ZapA é uma metaloprotease que cliva imunoglobulinas (SENIOR et al., 1991), proteínas do citoesqueleto, da matriz do hospedeiro e peptídeos antimicrobianos (BELAS et al., 2004). Neste presente trabalho, foram encontrados 6,25% (3 isolados) com o gene *zapA*. Já Carson et al., (2011), encontraram 160 amostras (100%) com este gene. ZapA é expressa em muitas cepas de *P. mirabilis* (SENIOR et al., 1987; BELAS et al., 2004). Esta enzima é importante para a colonização e posterior infecção do trato urinário, possuindo atividade de degradação de IgA (PHAN et al., 2008). Estudos têm demonstrado que uma atividade protease que degrada IgA está presente na urina de pacientes com ITU de *P. mirabilis* (BELAS; SUVANASUTHI, 2004; MOBLEY; BELA, 1995; WALKER et al., 1999; SENIOR et al., 1991; LOOMES et al., 1992), sugerindo que ZapA participa na patogênese do trato urinário, degrada vários substratos, incluindo imunoglobulina A (IgA) e defensas do sistema imunitário do hospedeiro (PHAN et al., 2008; WALKER et al., 1999; WASSIF; BELAS, 1995).



Figura 02 - Formação de cristais *in vitro* por *Proteus mirabilis* em ágar urina. O pool de urina humana foi filtrado e adicionado em uma concentração final de ágar a 1%. Foi incubado a 37°C por 48h. Forma estruvita, aparência dendrítica (seta menor) e apatita, forma X (seta maior).

As adesinas favorecem a adesão às células do hospedeiro e formação de biofilme, sendo um dos principais mecanismos de patogenicidade a fim de estabelecer a infecção (ALAMURI et al., 2010). Das 47 amostras estudadas, 91% apresentaram capacidade para a formação de biofilme em placas de poliestireno (Figura 03). Conforme foi descrito por outros autores a maioria das cepas de *P. mirabilis* apresenta capacidade de formação de biofilme (MELO, 2010; ROCHA et al., 2005; JANSEN et al., 2004; SABBUBA et al., 2002). As cepas consideradas como formadoras de biofilme foram as que apresentaram uma D.O > 0,2 (MELO, 2010).

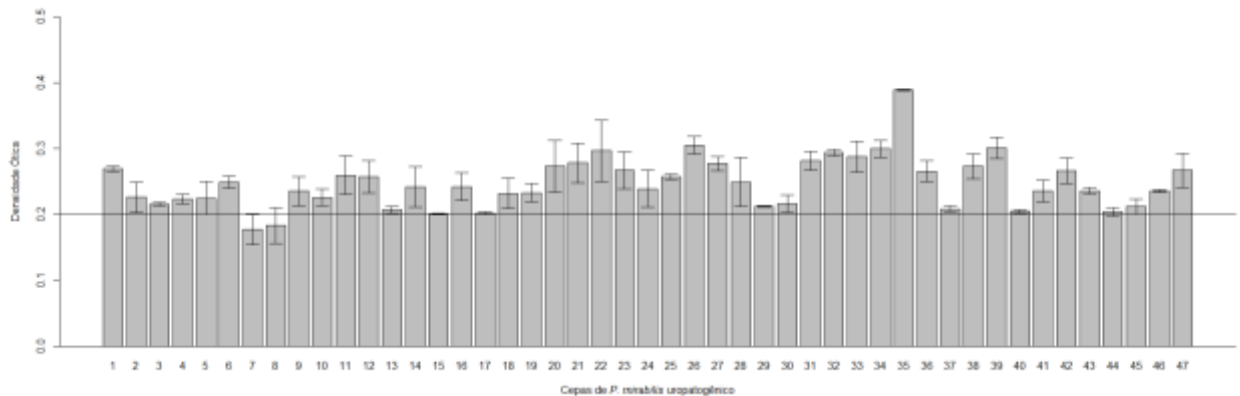


Figura 03 - Densidade ótica referente a formação de biofilme das 47 cepas de *P. mirabilis*.

Segundo Melo (2010), 99% das cepas estudadas em seu trabalho formaram biofilme. Segundo Rocha (2005), Jansen (2004) e Sabbuba (2002), 100% das cepas apresentaram esta capacidade. Sendo nítida a importância do biofilme na patogênese de *P. mirabilis*. Esta variação de valores pode ser dada devido ao método realizado por cada um dos autores, meio cultivado ou até mesmo pela influência do ambiente em que elas se encontravam.

A formação de biofilme de *P. mirabilis* em material de cateter é um fenômeno bem documentado (MORRIS et al., 1997, SABBUBA et al., 2002, JANSEN et al., 2004). Estas estruturas podem bloquear drenagem da urina dos ureteres, resultando em refluxo e promover a progressão para pielonefrite, sepse e choque; bem como o bloqueio de cateter urinário (ARMBRUSTER et al., 2012). Deste modo, contribui para a persistência da infecção bacteriana, além de tornar o microrganismo mais resistente aos agentes antimicrobianos (TOKUDA et al., 2010).

Dada a importância das fímbrias para a formação de biofilmes (JANSEN et al., 2004, ROCHA et al., 2007), neste trabalho foram encontrados: 14,58% (7 isolados) *mrpA*, 70,83% (34 isolados) *fimH*, 77,08% (37 isolados), *pmfA* e 85,41% (41 isolados) *ucaA* e 0% *ecpA*.

Além da formação de biofilme em cateter (SCHAFFER e PEARSON, 2015), a fímbria MR/P também está relacionada com adesão (ROCHA et al., 2007) e consequentemente, colonização da bexiga e rins (MIRELES et al., 2015).

Um estudo realizado por Bijlsma et al. (1995), verificaram que todos os isolados de *P. mirabilis* testados apresentaram o gene *ucaA*. Pellegrino et al., (2013) relatou que as mutações na *ucaA* levam a uma diminuição da adesão às

células uroepiteliais e à capacidade de colonizar os rins de ratos. Neste trabalho foi encontrado 85,41% (41 isolados) com o gene *ucaA*.

Neste estudo, pesquisamos também a prevalência do gene *ecpA* em *P. mirabilis*, já que o mesmo está presente no genoma de outras Enterobactérias (RENDÓN et al., 2007; SALDAÑA et al., 2009). Curiel et al., (2013) demonstraram através da PCR que 96% das cepas de *K. pneumoniae* continham *ecpA* e 94% destas cepas produziam ECP durante a adesão a células epiteliais cultivadas sendo que 80% das cepas formadoras de biofilmes sobre vidro produziram ECP, sugerindo que a ECP é necessária, pelo menos *in vitro*, para a expressão desses fenótipos.

Este pilus tem sido relatado como auxiliar na adesão celular de patótipos de *E. coli* (EHEC, EPEC, EAEC e ETEC). Um estudo recente mostrou que ECP desempenha um papel na formação do biofilme e na aderência celular (GARNETT et al., 2012). Réndom et al., (2007) demonstraram que de 169 amostras analisadas de *E.coli*, 121 (71.6%) apresentaram a produção de ECP.

Os nossos dados mostraram que nenhuma das 47 amostras de *P. mirabilis* apresentaram este gene, apesar de ser encontrado em várias Enterobactérias (Martínez-Santos et al., (2012)).

Já o sideróforo (*ireA*), constitui um mecanismo de captação de ferro do hospedeiro para o metabolismo bacteriano (MARANGONI et al., 1998; VIEIRA et al., 2007). Nesta pesquisa, 54,16% (26 isolados) apresentaram o gene *ireA*.

O ferro é necessário para a patogenicidade de *P. mirabilis*, e a falta de ferro resulta na atenuação da virulência, codificando receptores que contribuem para a colonização da bexiga e do rim (MASSAD et al., 1994). Segundo Zunino et al., (2000), o sideróforo parece ser o mecanismo primário para a quelação do ferro em *P. mirabilis*, sendo mais prevalentes nos isolados de ITU do que nos isolados não-ITU.

Quanto a resistência aos Betalactâmicos, nenhuma das 47 amostras estudadas mostrou um perfil de produção de ESBL. Foram encontrados (Tabela 03): 100% sensível a MER, 91,4% sensível a STX (43 isolados), 100% sensível a AMI, 100% sensível a GEN, 100% sensível a ETP, 91,4% sensível a CFZ (43 isolados), 95,7% sensível a FOX (45 isolados), 95,7% sensível a KF (45 isolados) 95,7% sensível a NOR (45 isolados), 80,8% sensível a NAL (38 isolados), 97,8% sensível a LEV (46 isolados) e 95,7% sensível a CIP (45 isolados). Rebello; Regua Mangia

(2014) demonstram que a presença de bactérias resistentes variam de acordo com a região geográfica, origem da espécie e patótipo estudado.

P. mirabilis possui percentuais de resistência as cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina) (PELOSO, 2015) e possui uma maior taxa de cepas resistentes a esses antimicrobianos em comparação com drogas mais recentes, como o grupo de quinolonas e fluoquinolonas (LEVY, MARSHALL 2004).

ITU causada por *P. mirabilis* pode ser difícil de tratar uma vez que as bactérias podem persistir no trato urinário devido a complicações como formação de cálculos na bexiga e nos rins, obstrução de cateteres ou resistência antimicrobiana (NIELUBOWICZ; MOBLEY, 2010). Embora as ITU sejam comumente tratadas com antibióticos, tais regimes são menos bem sucedidos no caso de cepas resistentes aos mesmos, como em ITUs recorrentes, pacientes cateterizados e naqueles com anormalidades do trato urinário ou quando os cálculos renais, atuam como focos para a persistência bacteriana (SCAVONE et al., 2014).

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que *P. mirabilis* uropatogênico possui diversos fatores de virulência, é citotóxico, capaz de formar cálculos urinários, biofilme, constituindo-se um problema de saúde humana, principalmente para pessoas que utilizam cateter urinário de demora. Observamos também, a sensibilidade a certos antibióticos de uso clínico. Devido a expressão de sua potente urease, deve-se tomar o devido cuidado na escolha do antibiótico a ser utilizado no tratamento da ITU por esta bactéria, pois nem sempre a sensibilidade observada *in vitro* é a mesma que *in vivo* devido a produção de cristais.

REFERÊNCIAS

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

_____. Adhesion, invasion, and agglutination mediated by two trimeric

autotransporters in the human uropathogen *Proteus mirabilis*. **Infect Immun**, v. 78, n. 11, p. 4882-94, Nov 2010.

ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 11, p. 743-54, Nov 2012.

BELAS, R.; MANOS, J.; SUVANASUTHI, R. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5159-67, Sep 2004.

BIJLSMA, I. G. W.; VAN DIJK, L.; KUSTERS, J. G.; GAASTRA, W. Nucleotide sequence of two fimbrial major subunit genes, *pmpA* and *ucaA* from canine-uropathogenic *Proteus mirabilis* strains. **Microbiol**, v. 141, p.1349–1357. 1995.

CARSON, L. et al. Comprehensive inhibitor profiling of the *Proteus mirabilis* metalloprotease virulence factor ZapA (mirabilysin). **Biochimie**, v. 93, n. 10, p. 1824-7, Oct 2011.

CESTARI, S.E. Detecção dos genes de hemolisina em isolados uropatogênicos de *Proteus mirabilis* e caracterização físico-química da hemolisina HpmA. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Londrina. 2011.

COKER, C. et al. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes Infect**, v. 2, n. 12, p. 1497-505, Oct 2000.

DIELUBANZA, E.J.; SCHAEFFER, A.J. Urinary Tract Infections in Woman. **Med. Clin. N. Am.** v. 95, n.1, p. 27-41, 2011.

FLANNERY, E. L.; MODY, L.; MOBLEY, H. L. Identification of a modular pathogenicity island that is widespread among urease-producing uropathogens and shares features with a diverse group of mobile elements. **Infect Immun**, v. 77, n. 11, p. 4887-94, Nov 2009.

GARNETT, J. A. et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by

the *Escherichia coli* common pilus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 10, p. 3950-5, Mar 2012.

HACHUL, M.; SIMONATO, N. S.; GARCIA FILHO, P. H.; MENDONÇA, R. R., DE OLIVEIRA, S. G. Infecção do trato urinário complicada. **RBM Rev. Bras. Med**, v. 72, n. 9. 2015.

JACOBSEN, S. M. et al. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clin Microbiol Rev**, v. 21, n. 1, p. 26-59, Jan 2008.

JANSEN, A. M. et al. Mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. **Infect Immun**, v. 72, n. 12, p. 7294-305, Dec 2004.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **J Infect Dis**, v. 181, n. 1, p. 261-72, Jan 2000.

KORONAKIS, V.; CROSS, M.; SENIOR, B.; KORONAKIS, E.; HUGHES C. The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 169, p 1509-1515. 1987.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat Medicine**, v.10, n. 12, p.122–129, 2004.

LOOMES, L. M.; SENIOR, B. W.; KERR, M. A. Proteinases of *Proteus*: purification, properties and detection in urine of infected patients. **Infect Immun**, v. 60, p. 2267-2273. 1992.

MARTÍNEZ-SANTOS, V. I. et al. Transcriptional regulation of the *ecp* operon by *EcpR*, IHF, and H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 194, n. 18, p. 5020-33, Sep 2012.

MASSAD, G. et al. *Proteus mirabilis* fimbriae: construction of an isogenic *pmfA* mutant and analysis of virulence in a CBA mouse model of ascending urinary tract infection. **Infect Immun**, v. 62, n. 2, p. 536-42, Feb 1994.

MASSAD, G.; MOBLEY, H. L. Genetic organization and complete sequence of the *Proteus mirabilis* pmf fimbrial operon. **Gene**, v. 150, n. 1, p. 101-4, Dec 1994.

MELO, R. O. Formação de biofilme em cateter urinário por *Proteus mirabilis* uropatogênico. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Londrina. 2010.

MOBLEY, H. L.; BELAS, R. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. **Trends Microbiol**, v. 3, n. 7, p. 280-4, Jul 1995.

MOBLEY, H. L.; CHIPPENDALE, G. R. Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. **J Infect Dis**, v. 161, n. 3, p. 525-30, Mar 1990.

MOHAMMED, R. A. G.; MOHAMMED, A. E. In Vitro Sensitivity of *Pseudomonas Aeruginosa* to Piperacillin, Azlocillin, Imipenem and Meropenem. **American J of Research Communication**, v. 4, n. 3, p. 107-117. 2016.

MORRIS, N. S.; STICKLER, D. J.; WINTERS, C. Which indwelling urethral catheters resist encrustation by *Proteus mirabilis* biofilms? **Br J Urol**, v. 80, n. 1, p. 58-63, Jul 1997.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. **Manual of Clinic Microbiol**, v. 1, n.9, p.1267, 2007.

NICOLLE, L. E. The chronic indwelling catheter and urinary infection in long-term-care facility residents. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 22, n. 5, p. 316-21, May 2001.

NIELUBOWICZ, G. R.; MOBLEY, H. L. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. **Nat Rev Urol**, v. 7, n. 8, p. 430-41, Aug 2010.

O'HARA, C. M.; BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 4, p. 534-46, Oct 2000.

OLIVEIRA, Adriana Cristina de; KOVNER, Christine Tassone; SILVA, Rafael Souza da. Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 2, p. 233-239, Apr. 2010.

PEERBOOMS, P. G., A. M. VERWEIJ, AND D. M. MACLAREN. Vero cell invasiveness of *Proteus mirabilis*. **Infect. Immun**, v.43, p.1068-1071.1984.

PEARSON, M. M. et al. Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. **J Bacteriol**, v. 190, n. 11, p. 4027-37, Jun 2008.

PELLEGRINO, R. et al. *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. **Pathog Dis**, v. 67, n. 2, p. 104-7, Mar 2013.

PELOSO, P.F.D. Uso racional dos antibióticos e infecção urinária de origem comunitária. **Labnetwork**, Ago, 2015.

PHAN, V. et al. ZapA, a virulence factor in a rat model of *Proteus mirabilis*-induced acute and chronic prostatitis. **Infect Immun**, v. 76, n. 11, p. 4859-64, Nov 2008

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

RAMPURE, R.; GANGANE, R; OLI, A.K. Prevalence of MDR-ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples. **J Microbiol Biotechnol Res**, v. 3, n. 1, p. 32–39, 2013.

RENDÓN, M. A. et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common

pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 25, p. 10637-42, Jun 2007.

ROCHA, S. P. et al. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 319-26, Nov 2007.

ROCHA, S.P. Participação da Fímbria MR/P de *Proteus mirabilis* uropatogênico no modelo de adesão agregativa em células Hep-2. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

SABBUBA, N.; HUGHES, G.; STICKLER, D. J. The migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over Foley catheters. **BJU Int**, v. 89, n. 1, p. 55-60, Jan 2002.

SALDAÑA, Z. et al. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. **J Bacteriol**, v. 191, n. 11, p. 3451-61, Jun 2009.

SCAVONE, P. et al. Native flagellin does not protect mice against an experimental *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection and neutralizes the protective effect of MrpA fimbrial protein. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 6, p. 1139-48, Jun 2014.

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 5, Oct 2015.

SENIOR, B. W.; ALBRECHTSEN, M.; KERR, M. A. *Proteus mirabilis* strains of diverse type have IgA protease activity. **J Med Microbiol**, v. 24, n. 2, p. 175-80, Sep 1987.

SENIOR, B. W.; HUGHES, C. Production and properties of haemolysin from clinical isolates of Proteeae. **J Med Microbiol**, v. 24, p. 17-25. 1987.

SENIOR, B. W.; LOOMES, I. M.; KERR, M. A. The production and activity in vivo of

Proteus mirabilis IgA protease in infections of the urinary tract. **J. Med. Microbiol**, v. 35, p. 203–207. 1991.

SILVA, M.R.L. Caracterização Genética e Fenotípica de Fatores de Virulência de *Proteus mirabilis* uropatogênico isolados na região de Londrina. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

SILVA, M.R.L.; ROCHA, S.P.D.; QUESADA, R.; PELAYO, J.S. In vitro stone formation by uropathogenic *Proteus mirabilis* in urine agar. **Biosaúde**. v. 4. 2002.

STICKLER, D. J. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. **Nat Clin Pract Urol**, v. 5, n. 11, p. 598-608, Nov 2008.

STRUBLE, K.; BRONZE, M. S.; JACKSON, R. L.; GONZALEZ, G. *Proteus* infections. **eMedicine Infect. Diseases**. 2009.

SWIHART, K. G.; WELCH, R. A. The HpmA hemolysin is more common than HlyA among *Proteus* isolates. **Infect. Immun**, v.58, p.1853-1860. 1990.

_____. Cytotoxic activity of the *Proteus* hemolysin HpmA. **Infect. Immun**. v. 58, p. 1861-1869. 1990.

TOKUDA, K. et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiol Immunol**, v. 54, n. 6, p. 320-9, Jun 2010.

TORZEWSKA, A. et al. In vitro studies of epithelium-associated crystallization caused by uropathogens during urinary calculi development. **Microb Pathog**, v. 71-72, p. 25-31, 2014 Jun-Jul 2014.

VIEIRA, J. M. D. S.; SARAIVA, R. M. C.; MENDONÇA, L. C. D. V.; FERNANDES, V. O.; PINTO, M. R. D. C.; VIEIRA, A. B. R. Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA. **Rev. Bras. Anal. Clin**, v. 39, n. 2, p. 119-121, 2007.

WALKER, K. E. et al. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. **Mol Microbiol**, v. 32, n. 4, p. 825-36, May 1999.

WASSIF, C.; CHEEK, D.; BELAS, R. Molecular analysis of a metalloprotease from *Proteus mirabilis*. **J Bacteriol**, v. 177, n. 20, p. 5790-8, Oct 1995.

ZUNINO, P. et al. *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 11, p. 3231-7, Nov 2003.

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

CONCLUSÕES

Este estudo comprova que *Proteus mirabilis* é um dos principais agentes causais de infecções do trato urinário, devido os seus fatores de virulência. É capaz de formar cálculos, apresentou citotoxicidade em células Vero, biofilme e apesar das cepas se mostrarem sensíveis a antibióticos de uso clínico, deve-se tomar o devido cuidado na escolha do antibiótico a ser utilizado no tratamento das infecções causadas por esta bactéria devido a formação de cristais.