



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SILVIA EMANOELE CESTARI

**DETECÇÃO DOS GENES DE HEMOLISINAS EM ISOLADOS
UROPATOGÊNICOS DE *Proteus mirabilis* E
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA HEMOLISINA
HpmA**

SILVIA EMANOELE CESTARI

**DETECÇÃO DOS GENES DE HEMOLISINAS EM ISOLADOS
UROPATOGÊNICOS DE *Proteus mirabilis* E
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA HEMOLISINA
HpmA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Dra. Jacinta Sanchez Pelayo.

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processo Técnico da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C422d Cestari, Silvia Emanoele.

Detecção dos genes de hemolisinas em isolados uropatogênicos de *Proteus mirabilis* e caracterização físico-química da hemolisina HpmA / Silvia Emanoele Cestari. – Londrina, 2011.

43 f. : il.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2011.

Inclui bibliografia.

1. *Proteus* (Bactéria) – Teses. 2. Infecções urinárias – Teses. 3. Hemólise e hemolisinas – Teses. 4. Virulência (Microbiologia) – Teses. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

SILVIA EMANOELE CESTARI

**DETECÇÃO DOS GENES DE HEMOLISINAS EM ISOLADOS
UROPATOGÊNICOS DE *Proteus mirabilis* E CARACTERIZAÇÃO
FÍSICO-QUÍMICA DA HEMOLISINA HpmA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Rosa Elisa C. Linhares
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Emerson José Venâncio
UEL – Londrina - PR

Londrina, 17 de Junho de 2011.

Por representarem o que há de mais importante e sólido em minha vida, dedico este trabalho aos anjos inundados de amor e luz, aos quais Deus, em sua infinita bondade, deu a mim o privilégio de chamá-los simplesmente de Pai e Mãe.

AGRADECIMENTOS

À minha querida mãe, *Ana Rocha Cestari*, pelo amor e apoio incondicionais, pelos valiosos conselhos, pela força nos momentos difíceis e por ter feito de tudo para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

Ao meu pai, *Orlando Cestari*, que mesmo não estando aqui conosco faz-se presente em todos os momentos da minha vida com os conselhos, ensinamentos deixados e amor dedicado até o momento de sua partida.

À minha orientadora, Dra. *Jacinta Sanchez Pelayo*, pelo apoio, dedicação, paciência e compreensão no desenvolvimento deste trabalho e pelos ensinamentos.

À Dra. *Halha Ostrensky Saridakis*, pelo carinho e prestatividade sempre ao esclarecer minhas dúvidas. Pelas importantes contribuições dadas neste e em outros trabalhos e, é claro, por sua inestimável amizade.

Ao Dr. *Emerson Venâncio* por sua colaboração, disponibilidade constante, sugestões e participação na Banca Examinadora da Qualificação.

Aos animados companheiros de laboratório, *Claci, Hugo, Tati, Lucinha, Paulo, Nicole*, pela amizade, bate-papos e pelos tantos momentos alegres.

À amiga *Claci* pela agradável convivência e, principalmente, pelas alegrias, conselhos, tristezas e carinho compartilhados nos inúmeros “cafés”.

Ao *Lucas* por todo seu amor, confiança, carinho e por constantemente me incentivar.

Aos colegas e amigos da turma do mestrado, pelo companheirismo, aprendizagem, experiências compartilhadas e por todos os momentos em que nos divertimos juntos.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia da UEL pelos ensinamentos e auxílio na realização deste trabalho.

Aos colegas do Interlaboratório *Claci, Iara, Jussevânia, Irene, Mari e Val* pelos inúmeros cafés da manhã e conversas divertidas.

A toda minha família (irmãos(as), tios(as), primos(as), madrinha) por serem a base forte e sólida na qual me apoio em todos os momentos da vida e por serem exemplo de amor e companheirismo, por todo carinho e pelos maravilhosos e abençoados finais de semana em que estamos sempre reunidos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu mais profundo e sincero: **Muito Obrigada!**

CESTARI, Sílvia. Emanoele. **Detecção dos genes de hemolisinas em isolados uropatogênicos de *Proteus mirabilis* e caracterização físico-química da hemolisina HpmA**. 2011. 43 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Infecção do trato urinário (ITU) é uma das infecções bacterianas mais frequentemente documentados em humanos. *Proteus mirabilis* está associado principalmente a ITU em indivíduos com anormalidade urinária ou relacionada com cateterismo vesical e que podem ser difíceis de tratar, devido à formação de cálculos na bexiga e rins. Estes cálculos são formados devido à presença de urease sintetizada pelas bactérias. Outro fator importante é que a hemolisina HpmA produzida por *P. mirabilis* é utilizada pelas bactérias para danificar os tecidos renais. Amostras de *Proteus* spp. também podem expressar hemolisina HlyA, semelhante à encontrada em *Escherichia coli*. Um total de 211 isolados uropatogênicos de *P. mirabilis* foram analisados para detectar a presença dos genes *hpmA* e *hpmB* pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e dot blot e o gene *hlyA* por PCR. Os genes *hpmA* e *hpmB* foram expressos pela técnica RT-PCR e dois isolados de *P. mirabilis* foram sequenciados para os genes *hpmA* e *hpmB*. A presença dos genes *hpmA* e *hpmB* foi confirmada por PCR em 205 (97,15%) dos 211 isolados. O dot blot confirmou a presença dos genes *hpmA* e *hpmB* nos isolados que não amplificaram na PCR. Nenhum dos isolados estudados apresentou o gene *hlyA*. Os genes *hpmA* e *hpmB* que foram sequenciados apresentaram 98% de identidade com os mesmos genes da amostra de *P. mirabilis* HI4320. Este estudo mostrou que a técnica de PCR apresenta boa sensibilidade para detectar os genes *hpmA* e *hpmB* de *P. mirabilis*.

Palavras-chave: *Proteus mirabilis*. Infecção do trato urinário. Hemolisina. PCR, Dot Blot. RT-PCR.

CESTARI, Silvia. Emanoele. **Detecção dos genes de hemolisinas em isolados uropatogênicos de *Proteus mirabilis* e caracterização físico-química da hemolisina HpmA**. 2011. 43 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Urinary tract infection (UTI) is one of the bacterial infections frequently documented in humans. *Proteus mirabilis* is associated with UTI mainly in individuals with urinary tract abnormality or related with vesicular catheterism and it can be difficult to treat because of the formation of stones in the bladder and kidneys. These stones are formed due to the presence of urease synthesized by the bacteria. Another important factor is that *P. mirabilis* produces hemolysin HpmA, used by the bacteria to damage the kidney tissues. *Proteus* spp. samples can also express HlyA hemolysin, similar to that found in *Escherichia coli*. A total of 211 uropathogenic *P. mirabilis* isolates were analyzed to detect the presence of the *hpmA* and *hpmB* genes by the techniques of polymerase chain reaction (PCR) and dot blot and *hlyA* by PCR. The *hpmA* and *hpmB* genes were expressed by the RT-PCR technique and two *P. mirabilis* isolates were sequenced for the *hpmA* and *hpmB* genes. The presence of the *hpmA* and *hpmB* genes was confirmed by PCR in 205 (97.15%) of the 211 isolates. The dot blot confirmed the presence of the *hpmA* and *hpmB* genes in the isolates that did not amplify in the PCR. None of the isolates studied presented the *hlyA* gene. The *hpmA* and *hpmB* genes that were sequenced presented 98% identity with the same genes of the HI4320 *P. mirabilis* sample. This study showed that the PCR technique has good sensitivity for detecting the *hpmA* and *hpmB* genes of *P. mirabilis*.

Keywords: *Proteus mirabilis*. Urinary tract infection. Hemolysin. PCR. Dot Blot. RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ciclo de *swarming* de *Proteus* crescendo em meio sólido 15
- Figura 2** - Formação *in vitro* de cálculos em forma de X () e forma dendrítica (→) por *P. mirabilis* em ágar urina..... 18
- Figura 3** –Representação esquemática da ação de uma proteína formadora de poros na membrana celular.....20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	INFEÇÕES DO TRATO	10
2.2	PROTEUS SPP	12
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA DE PROTEUS MIRABILIS.....	13
2.3.1	Fímbrias.....	13
2.3.2	Flagelo.....	13
2.3.3	Urease	16
2.3.4	Hemolisinas	18
2.3.5	Cápsula	23
2.4	INFLUÊNCIA DE AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA HEMOLISINA DE P. MIRABILIS	24
	REFERÊNCIAS	25
3	OBJETIVO GERAL	31
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
	ARTIGO: Molecular detection of HpmA nd HlyA hemolysin of uropathogenic Proteus mirabilis	32

1 INTRODUÇÃO

Proteus mirabilis é uma bactéria móvel, gram-negativa, pertencente à Família *Enterobacteriaceae*. É encontrado no intestino de humanos e animais, no solo e água poluída. É o agente causal mais comum depois de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* de infecção do trato urinário (ITU) complicada e a segunda causa mais comum depois de *Providencia stuartii* de bacteriúria relacionada a cateter vesical em grupos de pacientes com cateter.

As ITUs causadas por *P. mirabilis* são conhecidas por serem frequentemente persistentes, de difícil tratamento podendo ser fatais, dependendo da severidade da doença nos pacientes. As complicações da infecção principalmente em pacientes cateterizados incluem o desenvolvimento de urolitíase, bacteriúria e obstrução do trato urinário e de cateteres.

Este microrganismo possui vários fatores de virulência que são importantes na ITU, incluindo a adesão ao uroepitélio mediada por fímbrias, flagelos (associados com o fenômeno *swarming*), produção de urease, invasão da célula eucariótica, quebra de IgG e IgA por enzimas proteolíticas e produção de hemolisinas.

As hemolisinas de *P. mirabilis* são toxinas formadoras de poros que se inserem em alvos na membrana de células eucariontes, causando efluxo de sódio. Não são consideradas um fator essencial na fase inicial da infecção do trato urinário inferior, mas são importantes nas do trato urinário superior, como na pielonefrite. Podem ser detectadas pela lise de hemácias de carneiro, pela visualização de um halo de hemólise ao redor do crescimento bacteriano em ágar sangue ou em microplaca.

Existem relatos de dois tipos de atividade hemolítica em *Proteus* spp., uma associada à célula (HpmA) e outra extracelular (HlyA). Há evidências 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 células Vero (rim de macaco verde Africano).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO

As infecções do trato urinário (ITU) são as mais frequentemente documentadas em humanos, tanto em hospitais quanto na comunidade (STAMM; HOOTON, 1993; WARREN et al., 1999). Ocorrem através de uma rota ascendente. O microrganismo de origem fecal coloniza a região periuretral, entra na bexiga, onde então se multiplica e pode manter-se nesse local ou, ascender, pelos ureteres, até os rins. Indivíduos com alto risco para ITU incluem neonatos, mulheres sexualmente ativas e homens e mulheres que estejam utilizando cateter uretral (MOBLEY, 2000).

Algumas cepas mais virulentas podem invadir a corrente sanguínea e causar infecção sistêmica (LI et al., 2002). A ITU é responsável pela maioria das consultas urológicas; afeta cerca de 20 a 30% das mulheres e é a causa de cerca de 40% das infecções contraídas durante uma internação hospitalar. Estima-se que nos EUA 10,8% das mulheres tenham pelo menos um episódio por ano de ITU, ocorrendo mais comumente entre 18 e 24 anos (17,5%). Nas mulheres acima de 26 anos, a incidência de ITU diminui, voltando a aumentar após a menopausa (BARROS et al., 2008).

As ITU estão entre as mais comuns de todas as infecções vistas na clínica médica; perdendo apenas para as infecções respiratórias, elas são responsáveis por três milhões de visitas a consultórios médicos nos EUA (ORENSTEIN; WONG, 1999).

Em recém nascidos, devido a um maior número de más formações congênitas, as ITU acometem preferencialmente o sexo masculino (75%). Em crianças acima de três meses de idade, aproximadamente 90% das ITU se manifestam no sexo feminino (HEILBERG; SCHOR, 2003). Na vida adulta a incidência no sexo feminino aumenta o que parece estar relacionada com início da vida sexual. Na mulher a uretra é mais curta, com isso é maior a proximidade do ânus com o vestíbulo vaginal e uretra. No homem, é maior o comprimento uretral, maior o fluxo urinário e o fator antibacteriano prostático são protetores, assim, a susceptibilidade a ITU na mulher é maior. Após os 60 anos de idade a incidência de ITU aumenta podendo atingir entre 3% a 4% dos homens e tem relação com

quadros de hiperplasia prostática (DALBOSCO et al., 2003; HEILBERG; SCHOR, 2003).

A ITU pode causar tanto cistite quanto pielonefrite. O termo cistite é usado para descrever uma síndrome envolvendo disúria e inflamação com infiltração de leucócitos, a qual pode ser provocada por infecção bacteriana na bexiga. Pielonefrite aguda é descrita como uma síndrome acompanhada por uma significativa bacteriúria e infecção aguda no rim (MANDELE et al., 2000). Pode ser chamada também de infecção do trato urinário alto, por refletir alterações anatômicas e/ou estruturais renais decorrentes de um processo inflamatório bacteriano agudo acometendo o rim e estruturas adjacentes. Não representa uma síndrome clínica típica, sendo essa designação empregada para caracterizar achados histopatológicos (fibrose cortical e lesão túbulointersticial) ou radiológicos (deformidade calicial e retração parenquimatosa). A pielonefrite crônica pode evoluir com quadro clínico de infecções recorrentes, piúria, anemia e emagrecimento (RICCETTO, 2004).

A maioria dos episódios de pielonefrite é causada por ascensão de bactéria a partir da bexiga através dos ureteres. Geralmente a infecção inicial se instala na bexiga; o edema associado às cistites pode causar alterações na junção ureterovesical suficientes para permitir o refluxo de urina. Essa ascensão é potencializada se as bactérias possuem adesinas ou se houver alguma interferência no peristaltismo ureteral. A infecção por via hematogênica ou linfática é rara. A pielonefrite pode apresentar como complicações a sepse, cicatrizes no parênquima renal e alterações funcionais permanentes do trato renal (BARROS et al., 2008).

As ITU são em geral causadas por bactérias Gram-negativas aeróbias facultativas presentes na microbiota intestinal. Nas infecções urinárias agudas sintomáticas existe nítida predominância de *Escherichia coli*, enquanto que nas infecções crônicas ou adquiridas em ambiente hospitalar ou relacionadas com anomalias estruturais do trato urinário existe uma incidência mais equitativa das diferentes enterobactérias, com o aumento da prevalência de infecções causadas por *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.*, e por Gram-positivos, como *Enterococcus sp.* e *Staphylococcus sp.* (DALBOSCO et al., 2003). Estas infecções causam desde cistite até sérias complicações como pielonefrite,

bacteremia e formação de cálculos, com bloqueio de cateteres e danos severos ao tecido renal (RÓZALSKI et al., 1997; COKER et al., 2000).

Proteus mirabilis é a 3ª causa mais comum (depois de *E. coli* e *K. pneumoniae*) de ITU complicada (causando 12% de infecções) e a segunda causa mais comum (depois de *Providencia stuartii*) de bacteriúria relacionada a cateter vesical em grupos de pacientes com cateter (causando 15% de infecção). ITU causadas por *P. mirabilis* são conhecidas por serem frequentemente persistentes, de difícil tratamento e até fatais. As complicações da infecção em pacientes cateterizados incluem o desenvolvimento de urolitíase, formação de cálculos na bexiga e rins, e bacteriúria (NIEL-WEISE; VAN DEN BROEK, 2005).

2.2 *PROTEUS* SPP.

Proteus spp. compreende bastonetes Gram-negativos móveis, pertencentes à família Enterobacteriaceae. Esse gênero consiste de cinco espécies (*P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. vulgaris*, *P. myxofaciens*, e *P. hauseri*) (BRENNER et al., 1995). A identificação e a tipagem de isolados clínicos de *Proteus* podem ser feitas por proteínas de membrana externa ou perfis enzimáticos (KAPPOS et al., 1992) e análise computadorizada de padrões eletroforéticos de proteínas intracelulares (COSTAS, 1993).

Proteus spp. são agentes causadores de uma variedade de infecções oportunistas incluindo as do trato respiratório inferior e superior, olhos, ouvidos, garganta, queimaduras e feridas; também podem causar gastroenterites. Esses microrganismos exibem atividade proteolítica sob condições de aerobiose e anaerobiose facultativa. A desaminação oxidativa de aminoácidos e a habilidade de hidrolisar uréia com produção de amônia e dióxido de carbono são as propriedades bioquímicas mais representativas dessas bactérias (LIMA et al., 2007).

Esses microrganismos, sob condições favoráveis, são capazes de causar infecções nosocomiais, principalmente em pacientes geriátricos, paraplégicos e em pacientes em unidades de terapia intensiva, os quais são, muitas vezes, imunocomprometidos (LIMA et al., 2007). Essas infecções são associadas principalmente com as espécies *P. vulgaris*, *P. penneri* e *P. mirabilis*. Este último é o patógeno mais frequentemente associado a infecções, o que pode ser explicado por sua maior frequência (25%) no intestino humano. No homem o intestino é o maior

reservatório dessas bactérias e isso pode resultar em infecções endógenas ou transmissão da bactéria entre pacientes nos hospitais (CHOW et al., 1979).

P. mirabilis apresentam muitos fatores de virulência como a produção de fímbrias, flagelos (associados com o fenômeno *swarming*), urease, proteases, hemolisinas e cápsula (RÓZALSKI et al. 1997).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *PROTEUS MIRABILIS*

Os principais fatores de virulência e sua contribuição na patogenicidade das infecções urinárias estão especificados na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais fatores de virulência de *Proteus mirabilis*.

Fator de virulência	Contribuição para a patogenicidade
Fímbria	Aderência da bactéria ao tecido epitelial;
Flagelo	Ascensão da bactéria do ureter aos rins;
Urease	Elevação do pH durante o crescimento bacteriano resultando em formação de cálculos; citotoxicidade em células epiteliais do túbulo proximal humano;
Hemolisina	Capacidade de lisarem eritrócitos, células eucarióticas como fibroblastos humanos, monócitos, granulócitos e células endoteliais;
Cápsula	Formação de biofilme e cálculos.

Fonte: RÓZALSKI et al., (1997).

2.3.1 Fímbrias

As fímbrias têm como principal função a aderência da bactéria à célula do hospedeiro. São apêndices constituídos de proteínas que variam no tamanho e diâmetro, consistindo de um polímero com uma subunidade protéica adesiva na extremidade ou intercalado por várias destas subunidades, que se projetam da célula bacteriana (EDWARDS; PUENTE, 1998).

A adesão exerce papel importante na patogênese da ITU e diferenças na habilidade das bactérias com suas adesinas específicas, em ligarem-se às células hospedeiras dotadas de receptores específicos, influenciam a susceptibilidade do indivíduo a tais infecções (DAIFUKU; STAMM, 1986).

A adesão à superfície epitelial é um dos fatores mais importantes de virulência bacteriana no início das ITU (REID; SOBEL, 1987). *P. mirabilis* habita principalmente o trato intestinal, de onde coloniza a região periuretral e então ascende à bexiga, causando bacteriúria sintomática e/ou assintomática. Dados obtidos por vários autores sugerem que a adesão às células uroepiteliais é muito importante nas infecções causadas por *P. mirabilis* (SAVOIA et al., 1983; CELLINI et al., 1987; ROCHA et al. 2007a).

A capacidade de adesão é frequentemente associada com a presença de fímbrias na célula bacteriana. Isso mostra que as fímbrias são responsáveis pela fixação do *P. mirabilis* as células epiteliais. *P. mirabilis* pode simultaneamente expressar diferentes tipos de fímbrias que podem contribuir para a colonização do trato urinário através da adesão específica a receptores no uroepitélio; fímbria não aglutinante (NAF), fímbria *P. mirabilis* (PMF), fímbria temperatura ambiente (ATF) e Manose-resistente/*Proteus*-like (MR/P) (ROCHA et al., 2007b).

Estudo realizado no Brasil por Rocha et al. (2007a) mostrou que isolados uropatogênicos de *P. mirabilis* apresentavam um modelo de adesão agregativo semelhante ao encontrado em *E. coli* enteroagregativa e todas as cepas apresentavam os genes *mprA* e *mprB* da fímbria MR/P.

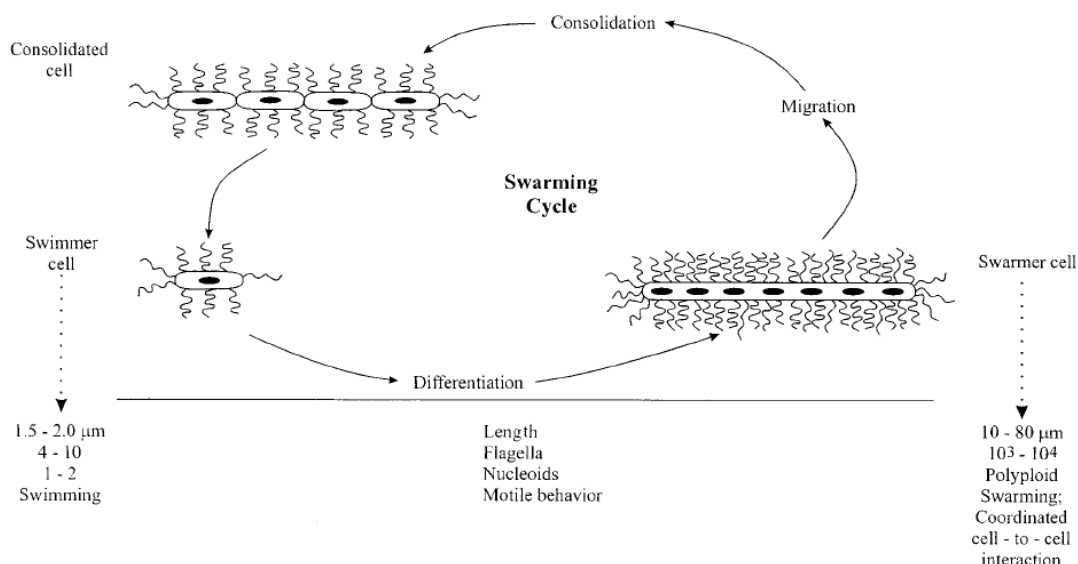
2.3.2 Flagelo

A presença de flagelos na superfície de bactérias facilita a colonização e disseminação a partir do local inicial de instalação do microrganismo. A associação da motilidade com a virulência de bacilos gram-negativos flagelados como *Vibrio cholerae* (GUENTZEL; BERRY, 1975) e *Pseudomonas aeruginosa* (MCMANUS et al., 1980) já foi demonstrada.

P. mirabilis são bactérias dimórficas podendo se apresentar sob duas formas: *swimmer* e *swarmer*. Quando estão na forma *swimmer* se apresentam com morfologia típica; bastonetes com 1,0 a 2,0µm de comprimento, móveis com 6 a

10 flagelos peritríquios por célula. Já na forma *swarmer* se apresentam como células alongadas podendo apresentar de 50 a 80µm de comprimento e hiperflagelados (Figura 1). As células *swarmers* são formadas *in vitro* somente quando a bactéria cresce em meio sólido formando um fino véu; quando removidas e transferidas para meio líquido, diferenciam-se por formação de septo, divisão celular e redução de síntese flagelar (BELAS, 1992; MOBLEY; BELAS, 1995). A mudança da forma *swimmer* para a *swarmer* é uma resposta adaptativa da bactéria ao ambiente do hospedeiro para facilitar a colonização do trato urinário (STICKLER; ZIMAKOFF, 1994).

Figura 1 - Ciclo de *swarming* de *Proteus* crescendo em meio sólido



Fonte: (ALLISON; LAI; HUGHES, 1992; BELAS, 1992, 1996; MOBLEY; BELAS, 1995).

A diferenciação em célula *swarmer* e sua movimentação são cíclicas. O bacilo vegetativo (célula *swimmer*), como observado em cultura líquida, diferencia-se no meio sólido em célula altamente flagelada, poliplóide e alongada (*swarmer*). Esse processo é controlado através de sinais ambientais ou estímulos químicos específicos. Então a população de células *swarmer* migra rapidamente e coordenadamente até que o número de células seja reduzido. No estágio de consolidação o *swarming* é cessado e as células, após a desdiferenciação, são revertidas a células *swimmer* (ROZALSKI et al., 1997).

2.3.3 Urease

A uréia representa o principal produto nitrogenado excretado em humanos e na maioria dos animais. A urease (uréia amidohidrolase) catalisa a hidrólise da uréia liberando amônia e dióxido de carbono, que resulta no aumento do pH da urina (CLAPHAM et al., 1990; MOBLEY et al., 1995). A urease é encontrada em mais de 200 espécies de bactérias gram-negativas e gram-positivas (MOBLEY; BELAS, 1995; MOBLEY et al., 1995).

Essa enzima tem sido implicada como fator contribuinte na patogenicidade de muitas bactérias, incluindo espécies de *Proteus*, *Providencia*, e *Morganella* (JONES; MOBLEY, 1987). A produção da urease dessas bactérias é usada para distingui-las de outros membros da família Enterobacteriaceae. A urease de *P. mirabilis* é uma metaloenzima de 250-KDa associada ao níquel (Ni^0), produzida no citoplasma.

A atividade da enzima pode ser inibida por substâncias como análogos estruturais de uréia (hidroxiuréia, tiouréia, e metiluréia), ácidos hipúrico e acetohidroxâmico, fosforamidas, ácido bórico e borônico (BREITENBACH; HAUSINGER, 1988; MOBLEY; HAUSINGER, 1989).

A urease de *Proteus* é homóloga a urease de *Klebsiella aerogenes* (MOBLEY; JONES; PENNER, 1987), porém seu operon (6,45 kb) tem homologia com o operon da urease de *Providencia stuartii* (JONES; MOBLEY, 1988). Ela é codificada pelo cluster *ure*, que contém oito genes, *ureABC* para as subunidades estruturais, *ureEFG* para incorporação de níquel, *ureD* como um regulador positivo e *ureR* como indutor (NICHOLSON, 1993).

O papel da urease em infecções tem sido estudado por inúmeros autores (MUSHER et al., 1975; MACLEAN, 1986; MOBLEY et al., 1988) comprovando-se que essa enzima é fator de virulência importante em cepas de *P. mirabilis*.

A formação de cálculos é o papel primário da urease durante as ITU causadas por *P. mirabilis* (MOBLEY; WARREN, 1987; RODMAN, 1998). A hidrólise da uréia pela urease causa elevação do pH da urina, que resulta na precipitação dos componentes urinários como Mg^{2+} e Ca^{2+} , que são solúveis em pH levemente ácido ou neutro, característico na urina normal. Como resultado desse efeito, cristais de estruvita ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ou carbonato de apatita [$\text{C}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{CO}_3$] ou ambos, são

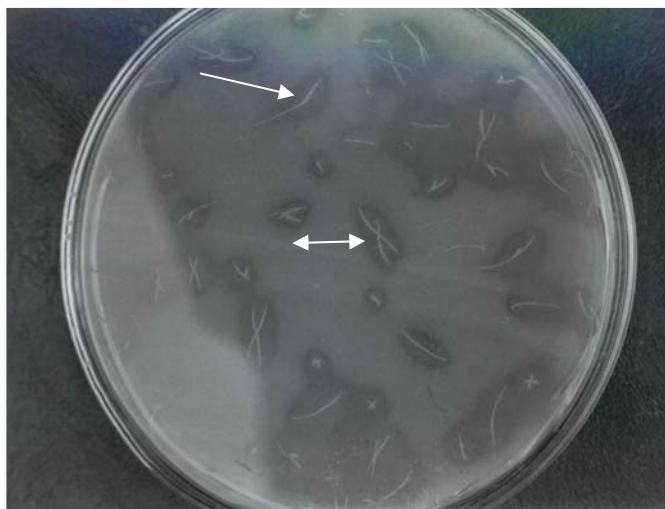
formados (MCLEAN et al., 1988; MOBLEY; HAUSINGER, 1989; CLAPHAM et al., 1990).

Em adição a atividade da urease, a cápsula gelatinosa formada por esse microrganismo (biofilme) também contribui no mecanismo de formação de cálculos. Mclean et al. (1988) formaram um conceito etiológico de formação de cálculos relacionado ao biofilme que pode ser dividido nas seguintes etapas: (i) *P. mirabilis* ascende ao trato urinário, coloniza o uroepitélio e então forma microcolônias envoltas no glicocálice o que facilita a adesão; (ii) a produção de urease pela bactéria eleva o pH da urina, resultando na precipitação de cristais de estruvita e de carbonato de apatita, os quais se agregam no glicocálice, protegendo os uropatógenos de antibióticos, anticorpos e inibidores de urease, bem como de mecanismos de defesa do hospedeiro; e (iii) incrustadas, as bactérias continuam a produção de glicocálice, a síntese de urease, e a incorporação dos elementos da matriz tecidual do hospedeiro (mucoproteínas e polissacarídeos); neste microambiente, ocorrem nucleação e formação de cristais de estruvita e carbonato de apatita e, finalmente, o cálculo maduro se parece com uma grande colônia de bactérias "fossilizada" (MCLEAN et al., 1988; MOBLEY; HAUSINGER, 1989; CLAPHAM et al., 1990).

P. mirabilis apresenta uma taxa de degradação de uréia de 6 a 30 vezes mais rápida quando comparada com outros microrganismos produtores de urease. Possivelmente esta é a razão pela qual as infecções causadas por *P. mirabilis* causem danos histológicos mais severos que as ITU causadas por *E. coli* e *Klebsiella* spp. e estejam diretamente relacionadas com a obstrução de cateteres enquanto outras bactérias ureolíticas não estão (JONES; MOBLEY, 1987; JOHNSON et al., 1993).

Silva; Pelayo (2003) demonstraram *in vitro* que *P. mirabilis* foi capaz de formar cálculos após 24 - 48 horas de incubação em ágar urina, os quais apresentaram formato de X e posteriormente desenvolveram uma aparência dendrítica (Figura 2).

Figura 2 - Formação *in vitro* de cálculos em forma de X () e forma dendrítica (→) por *P. mirabilis* em ágar urina



Fonte: (SILVA; PELAYO . 2003).

Mobley et al. (1991) mostraram *in vitro* que a urease apresenta efeito citotóxico sobre células epiteliais do túbulo proximal renal humano (HPRTEC). Estudos com modelos animais de ITU ascendente mostraram que cepas produtoras de urease persistiram nos rins e bexiga, ao contrário das não produtoras, e que causaram maior número de lesões renais severas (JONES et al., 1990; JOHNSON et al., 1993).

2.3.4 Hemolisinas

Hemolisinas produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas representam um grupo de toxinas que, diferentemente de muitas outras toxinas, não são internalizadas pelas células de mamíferos, atuando como agentes ativos de membrana levando à lise e morte celular (GORDON et al., 1989). As hemolisinas além de lisarem eritrócitos, podem também lisar outras células eucarióticas como fibroblastos humanos, monócitos, granulócitos e células endoteliais (JÜRGENS et al., 2002).

Smith, (1963), foi o primeiro a diferenciar as hemolisinas de *E. coli*, demonstrando que, sob as mesmas condições de cultivo, algumas cepas de *E. coli* produziam simultaneamente hemolisinas detectadas no sobrenadante de cultura e hemolisinas associadas às células. As hemolisinas ligadas às células não eram

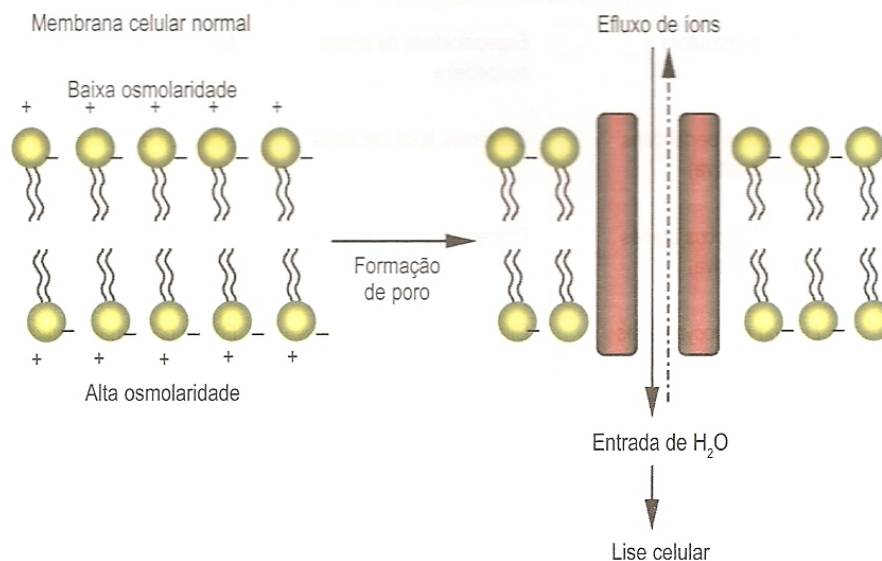
neutralizadas por anti-soro preparado contra a hemolisina liberada no meio de cultivo, indicando que as duas hemolisinas eram diferentes.

A síntese de hemolisinas pode ser dependente de uma série de fatores presentes no meio de cultura. Em presença de quelantes de ferro, a atividade hemolítica de algumas cepas de *E. coli* aumenta (MACKMAN et al., 1986). O cálcio foi descrito como sendo essencial para a ativação da α -hemolisina de *E. coli*, para a sua estabilidade e para a ligação da toxina às membranas dos eritrócitos (BOEHM et al., 1990).

O mecanismo de ação das hemolisinas na membrana da célula alvo varia, podendo ser enzimático que degrada os lipídeos da membrana, como no caso da fosfolipase da *Pseudomonas aeruginosa* (CHAKRABORTY et al., 1987), formador de poros que causam a lise osmótica celular pelo influxo de água, como as toxinas RTX de *Vibrio* sp. (WELCH, 1991), tiol-ativadas que tem sua ativação por agentes redutores, como a Estreptolisina O (BRAUN; FOCARETA, 1991) ou ainda, agir como surfactantes, que solubilizam a membrana celular por sua ação detergente, como a delta toxina do *Staphylococcus aureus* (ROWE; WELCH, 1994).

As hemolisinas de *P. mirabilis* são toxinas formadoras de poros (Figura 3) que se inserem em alvos na membrana de células eucariontes, causando efluxo de sódio, não sendo considerado um fator essencial na fase inicial da infecção do trato urinário inferior, mas são importantes nas infecções do trato urinário superior (ZUNINO et al., 1999; COKER et al., 2000). Podem ser detectadas através da lise de hemácias de carneiro, pela visualização de um halo de hemólise ao redor do crescimento bacteriano em ágar sangue (MORGAN et al., 1985) ou em microplaca (BURKE et al., 1984; MOBLEY; CHIPPENDALE, 1990).

Figura 3 – Representação esquemática da ação de uma proteína formadora de poros na membrana celular.



Fonte: TRABULSI, 5. ed., 2008.

Koronakis et al. (1987) e Welch (1987) relataram dois tipos de atividade hemolítica em *P. mirabilis*, uma associada à célula (HpmA) e outra extracelular (HlyA).

Em *Proteus* spp. a hemolisina associada à célula é cálcio independente, codificada por dois genes *hpmA* e *hpmB*, que codificam as proteínas HpmA (166 kDa) e HpmB (63 kDa), respectivamente (UPHOFF; WELCH, 1990). HpmA é responsável por dano tecidual e é ativada quando seu peptídeo N-terminal é clivado, sendo este passo essencial para secreção da hemolisina pela bactéria, resultando HpmA ativa (140 kDa) que fica armazenada no periplasma da bactéria. Já HpmB que está armazenada na membrana externa, ativa e transporta HpmA. A hemolisina HlyA tem sido relatada neste gênero, principalmente em cepas de *P. vulgaris* (SWIHART; WELCH, 1990).

A hemolisina HlyA de *E. coli* é um membro da uma família de citolisinas de bactérias Gram-negativas. Muitas destas toxinas apresentam propriedades estruturais ordinárias, especialmente em repetir um domínio na metade C-terminal da proteína, e por isso são chamados proteínas RTX. A estrutura primária da HlyA tem vários domínios diferentes. O C-terminal de HlyA é essencial para a sua secreção para fora da célula pelo sistema HlyB/HlyD juntamente com a porina TolC da membrana externa e sua ativação é catalisada pela proteína citoplasmática HlyC

e envolve acilação por uma proteína acil-transportadora. O domínio de repetição liga-se ao Ca^{2+} e pode ser a parte essencial da toxina para o reconhecimento do receptor na célula alvo de mamíferos mas não é essencial para a formação de canais na bicamada lipídica da membrana (LUDWIG et al., 1988). Estudos sobre a hemolisina de *E. coli* revelaram que duas outras regiões também podem estar envolvidas na formação de poros, o N-terminal e um domínio hidrófobo nos aminoácidos 177 e 411 (HARDIE et al., 1991).

A hemolisina HlyA produzida por diferentes microrganismos apresenta reação imunológica cruzada. Vários testes *in vitro* têm mostrado que a hemolisina HlyA de *E. coli* é capaz de formar poros nas membranas das células de mamíferos e do sistema imunológico (mastócitos humanos e leucócitos), causando lise celular e interrupção na atividade celular (GADEBERG; ORSKOV, 1984; KONIG et al., 1986).

Benz et al., (1994) estudaram a interação entre a bicamada lipídica da membrana e hemolisinas produzidas por *P. vulgaris* e *Morganella morganii*. Os resultados sugerem que as hemolisinas produzidas por esses microrganismos têm um modo de ação semelhante a HlyA de *E. coli*, ou seja, elas formam canais em membranas biológicas e artificiais. Como consequência, as membranas perdem sua função de barreira e íons e outras moléculas hidrofílicas, normalmente impermeáveis, podem penetrar nas membranas e lisar células.

Há evidências 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 células Vero (PEERBOOMS et al., 1984; SWIHART; WELCH, 1990).

Sênior e Hughes (1987) em estudos com cepas de *Proteus* spp. verificaram que 94% das cepas de *P. mirabilis* e 84% de *P. vulgaris* produziram fator hemolítico associado à célula e cálcio-independente, características da hemolisina HpmA. Além disso, eles verificaram que uma em cada seis cepas de *P. vulgaris* também produziu um fator hemolítico cálcio-dependente que é encontrado no sobrenadante, característica da hemolisina HlyA.

Koronakis et al. (1987) clonaram os genes responsáveis pela atividade hemolítica cálcio-dependente observada em isolados de *P. vulgaris*. O gene *hlyA* de *P. vulgaris* mostrou similaridade significativa de sequência com genes da família RTX. Os membros desta família de genes (*hlyA*, *hlyB*, *hlyC* e *hlyD*)

incluem os que codificam hemolisinas de *E. coli*, *P. vulgaris*, *M. morganii* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*. O operon *hlyA* de *E. coli* e *P. vulgaris* é composto por quatro genes: *hlyA* codifica a hemolisina estrutural, *hlyC* é necessário para a ativação de *hlyA*, e *hlyB* e *hlyD* são necessários para o transporte de *hlyA* (SWIHART; WELCH, 1990).

Swihart e Welch, (1990) detectaram a presença de HpmA na maioria dos isolados de *Proteus* spp., enquanto HlyA não foi detectado em *P. mirabilis* sendo encontrada em apenas 2 das 24 cepas de *P. vulgaris* estudadas. A maioria (97%) das cepas de *P. mirabilis* foram isoladas de ITU, sugerindo que HpmA é a hemolisina predominante em *Proteus* spp. e pode desempenhar papel importante em ITU causadas por *Proteus* spp. Estes pesquisadores também demonstraram que as atividades hemolítica e citotóxica são devidas à produção da hemolisina HpmA ativa (140kDa) utilizando cepas mutantes (HpmA negativas), que perderam tanto a capacidade hemolítica quanto citotóxica, em células humanas (epiteliais, monócitos) e em células Vero.

Kaca e Rózalski (1991) verificaram que a atividade hemolítica da HpmA ligada à célula em *P. mirabilis* é maior entre as fases log tardia e estacionária e é detectada nos filtrados de sobrenadantes extracelulares de culturas de *P. mirabilis* e *P. vulgaris* na fase estacionária-tardia e na de declínio, o que pode ser resultado da autólise bacteriana em culturas velhas.

Allison et al., (1992) demonstraram que ao contrário das células *swimmer*, as células *swarmer* de *P. mirabilis* mostram aumento substancial na atividade de urease intracelular, da hemolisina HpmA, e metaloproteases, portanto pode-se considerar que esse tipo celular é a forma capaz de causar os tipos de infecção mais severos como pielonefrite e bacteremia (ALLISON et al., 1994).

Em nosso laboratório (Laboratório de Bacteriologia – UEL), durante o ano de 2002, foi realizado um estudo com 35 cepas de *P. mirabilis* isoladas de pacientes com ITU. Dessas amostras 100% apresentaram atividade hemolítica em hemácias de carneiro e quando testadas em células Vero, após três horas de incubação a 37°C, foi observado efeito citopático e após seis horas lise total das células, reforçando os dados da literatura (SILVA et al., 2003).

2.3.5 Cápsula

A cápsula dos microrganismos contribui para a adesão bacteriana e também protege contra antimicrobianos. A cápsula de *P. mirabilis* está presente durante as infecções e contribui para a formação de cálculos, sendo esta característica exclusiva de *Proteus* spp., não observado em outros microrganismos produtores de urease. Os cristais de estruvita e carbonato de apatita ligam-se aos constituintes da cápsula como mucopolissacarídeos e mucoproteínas, servindo como suporte para a formação de cálculos (DUMANSKI et al., 1994).

As cápsulas de *Proteus* spp. tendem a ser ácidas devido à presença de ácidos urônicos, piruvato ou grupos fosfato, isso permite a esta estrutura ligar-se a cátions metálicos, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} via interações eletrostáticas (RÓZALSKI et al., 1997).

Clapham et al., (1990) em estudos *in vitro*, revelaram forte influência da cápsula bacteriana sobre a formação dos cálculos cristalinos. Desse experimento, eles concluíram que cristais de estruvita podiam se formar dentro de biofilmes de *P. mirabilis*.

Assim podemos observar que na interação entre patógenos bacterianos e células do hospedeiro, um papel significativo é desempenhado por estruturas de superfície da bactéria como: fímbrias, flagelo, cápsula. É certo que a superfície das células de *P. mirabilis* é muito importante para sua virulência, particularmente auxiliando na adesão, colonização do trato urinário e formação de cálculos.

2.4 INFLUÊNCIA DE AGENTES FÍSICO-QUÍMICOS NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA HEMOLISINA DE *P. MRABILIS*

Como dados a respeito da influência de agentes físico-químicos sobre a atividade hemolítica de *P. mirabilis* são escassos na literatura, vimos a importância de fazer um estudo para avaliar estes fatores.

A enterotoxina termoestável (ST) de *E. coli* é subdividida em STI e STII e ambas mostraram-se resistentes à temperatura de 100°C. A toxina STII foi sensível à tripsina e resistente a pH ácidos, e não a pH alcalinos (FUJII et al., 1991).

A enterotoxina termolábil (LT) é inativada quando aquecida a 60°C por 15 minutos e sensível ao tratamento com ácidos (MITCHELL et al., 1974; SEARS; KAPER, 1996).

Baratéla et al. (2001) verificaram que a atividade hemolítica da *Plesiomonas shigelloides* isoladas de água era dependente da composição do meio de cultura, da presença de cálcio e íons ferro, inativada a temperatura de 56°C por 10 minutos e sensível a tripsina.

Simi, (2004) estudando a atividade hemolítica em cepas de *Enterobacter cloacae*, verificou que a hemolisina era termoestável a 100°C por 30 minutos, resistente as enzimas proteolíticas (tripsina, proteinase K e pepsina), estável a pH ácido (2,0-6,0), porém sensível a pH maior do que 7,0. Barnes et al. (1997) estudando uma citotoxina de *E. cloacae* verificaram que a mesma era sensível ao tratamento com tripsina.

REFERÊNCIAS

- ALLISON, C. et al. The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*. **J. Infect. Dis.** v. 169, p. 1155-1158, 1994.
- 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, p.1583-1591, 1992.
- BARATÉLA, K.C. et al. Effects of medium composition, calcium, iron and oxygen haemolysin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. **J. Appl. Bacteriol.** v. 90, p. 482-487.
- BARNES, A.I. et al. Purification and characterization of a cytotoxin from *Enterobacter cloacae*. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 729-733, 1997.
- BARROS, L.R.; GLINA, C.G., GLINA, S. **Manual sobre infecções do trato urinário.** São Paulo: Office Editora, 2008.
- BELAS, R. The swarming phenomenon of *Proteus mirabilis*. **ASM News.** v. 58, p. 15-22, 1992.
- BENZ, R.; HARDIE, K.R.; HUGHES, C. Pore formation in artificial membranes by the secreted hemolysins of *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii*. **Eur. J. Biochem.** v. 220, p. 339-347, 1994.
- BOEHM, D.F.; WELCH, R.; SNYDER, I. Calcium is required for the binding of *Escherichia coli* hemolysin to erythrocyte membranes. **Infect Immun.** v. 58, p. 1951-1958, 1990.
- BRAUN, V.; FOCARETA, T. Pore-forming bacterial protein hemolysins. **Critical Rev Microbiol.** v. 18, p. 115-58, 1991.
- BREITENBACH, J.M.; HAUSINGER, R. P. *Proteus mirabilis* urease partial purification and inhibition by boric acid and boronic acid. **Biochem. J.** v. 250, p. 917-920, 1988.
- BRENNER, D.J. et al. Replacement of NCTC 4175, the current type strain of *Proteus vulgaris*, with ATCC 29905. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 45, p. 870-871, 1995.
- BURKE, V. et al. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 48, p. 361-366, 1984.
- CELLINI, L. et al. Adhesive properties of *Proteus* genus related to antimicrobial agents resistance. **Microbiologica** v. 10, p. 291-299, 1987.
- CHAKRABORTY, T. et al. Molecular analysis of bacterial cytolysins. **Rev Infect Dis**, v. 9, p. 456-466, 1987.

- CHOW, A.W. et al. A nosocomial outbreak of infection due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colonization as a major reservoir. **J. Infect. Dis.** v. 130, p. 621-627, 1979.
- CLAPHAM, L. et al. The influence of bacteria on struvite crystal habit and its importance in urinary stone formation. **J. Crystal Growth** v. 104, p. 475-484, 1990.
- COKER, C.; POORE, C.; LI, X.; MOBLEY, H. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microb. Infect.** v. 2, p. 1497-1505, 2000.
- COSTAS, M. et al. Identification and typing of *Proteus penneri* and *Proteus vulgaris* biogroups 2 and 3, from clinical sources, by computerized analysis of electrophoretic protein patterns. **J. Appl. Bacteriol.** v. 75, p. 489-498, 1993.
- DAIFUKU, R.; STAMM, W. E. Bacterial adherence to bladder uroepithelial cells in catheter-associated urinary tract infection. **N. Engl. J. Med.** v. 314, p. 1208-1213, 1986.
- DALBOSCO, V.; SROUGI, M.; DALL'OGGIO, M. Infecções do Trato Urinário. **Rev. Bras. Med.** v. 60, p. 320-336, 2003.
- DUMANSKI, A.J. et al. Unique ability of the *Proteus mirabilis* capsule to enhance mineral growth in infectious urinary calculi. **Infect. Immun.** v. 62, p. 2998-3003, 1994.
- EDWARDS, R.A.; PUENTE, J.L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 282-287, 1998.
- FUJII, Y. et al. Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. **J. Bacteriol.** v. 173, p. 5516-5522, 1991.
- GADEBERG, O.V.; ORSKOV, I. D.A. In vitro cytotoxic effect of alpha-hemolytic *Escherichia coli* on human blood Granulocytes, **Infect. Immun.** v. 45, p. 255-260, 1984.
- GORDON, V.M. et al. Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 14792-14796, 1989.
- GUENTZEL, M.N.; BERRY, L.J. Motility as a virulence factor for *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.** v. 11, p. 890-897, 1975.
- HARDIE, K.R. et al. In vitro activation of *Escherichia coli* prohemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular mass cytosolic polypeptide. **Molec. Microbiol.** v. 5, p. 1669-1679, 1991.
- HEILBERG, I.P.; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato Urinário (ITU). **Rev. Assoc. Bras. Med.** v. 49, p. 109-116, 2003.
- JONES, B. D.; MOBLEY, H. L. T. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. **Infect. Immun.** v. 55, p. 2198-2203, 1987.

JONES, B.D.: MOBLEY, H.L.T. *Proteus mirabilis* urease: genetic organization, regulation, and expression of structural genes. **J. Bacteriol.** v. 170, p. 3342-3349, 1988.

JONES, B.D. et al. Construction of urease-negative mutant of *Proteus mirabilis*: analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Infect. Immun.** v. 58, p. 1120-1123, 1990.

JOHNSON, D.E. et al. Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistent urolithiasis and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Infect. Immun.** 61:2748-2754. 1993.

JÜRGENS, D.; ÖZEL, M.; TAKAISI-KIKUNI, N.B. Production and characterization of *Escherichia coli* enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes. **Cell. Biol. Int.** v. 26, p. 175-186, 2002.

KACA, W.; RÓZALSKI, A. Characterization of cell-bound and cell-free hemolytic activity of *Proteus* strains. **Eur. J. Epidemiol.** v. 07, p. 159-165, 1991.

KAPPOS, T. et al. Outer membrane protein profiles and multilocus enzyme electrophoresis analysis for differentiation of clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris*. **J. Clin. Microbiol.** v. 30, p. 2632-2637, 1992.

KONIG, B. et al. Role of *Escherichia coli* alpha-hemolysin and bacterial adherence in infection: requirement for release of inflammatory mediators from granulocytes and mast cells. **Infect. Immun.** v. 54, p. 886-892, 1986.

KORONAKIS, V. et al. 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.

LI, X. et al. Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stone during experimental urinary tract infection. **Infect. Immun.** v. 70, p. 389-394, 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 vivo growth. **J. Med. Microbiol.** v. 56, p. 600-607, 2007.

LUDWIG, A. et al. The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca²⁺ dependent binding to erythrocytes. **Mol. Gen. Genet.** v. 214, p. 553-561, 1988.

MACKMAN, N. et al. Secretion of haemolysin of *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol Immunol.** v. 125, p. 159-181, 1986.

MANDELE, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. Principles and Practice of infectious diseases. Fifth Edition. **New York, N.Y.** p. 773-801, 2000.

MCLEAN, R.J.C. et al. Histochemical and biochemical urease localization in the periplasm and outer membrane of two *Proteus mirabilis* strains. **Can. J. Microbiol.** v. 32, p. 772-778, 1986.

MCLEAN, R.J.C. et al. The ecology and pathogenicity of urease-producing bacteria in the urinary tract. **Crit. Rev. Microbiol.** v. 16, p. 37-79, 1988.

MCMANUS, A.T.; MOODY, E.E.; MASON, A.D. Bacterial motility: a component in experimental *Pseudomonas aeruginosa* burn wound sepsis. **Burns** v. 6, p. 235-239, 1980.

MITCHELL, I.D.; TAME, M.J.; KENWORTHY, R. Separation and purification of enterotoxins from a strain of *Escherichia coli* pathogenic for pigs. **J. Med. Microbiol.**, v. 7, p. 439-450, 1974.

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

MOBLEY, H.L.T.; BELAS, R. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. **Trends Microbiol.** v. 3, p. 280-284, 1995.

MOBLEY, H.L.T.; CHIPPENDALE, G.R. Hemagglutinin, Urease and Hemolysin Production by *Proteus mirabilis* from Clinical Sources. **J. Infect. Dis.** v. 161, p. 525-530, 1990.

MOBLEY, H.L.T. et al. Citotoxicity of the HpmA hemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular epithelial cells. **Infect. Immun.** v. 59, p. 2036-2042, 1991.

MOBLEY, H.L.T. et al. MR/K hemagglutination of *Providencia stuartii* correlates with adherence to catheters and with persistence in catheter-associated bacteriuria. **J. Infect. Dis.** v. 157, p. 264-271, 1988.

MOBLEY, H.L.T.; ISLAND, M.D.; HAUSINGER, R.P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol. Rev.** v. 59, p. 451-480, 1995.

MOBLEY, H.L.T.; HAUSINGER, R.P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiol. Rev.** v. 53, p. 85-108, 1989.

MOBLEY, H.L.T.; JONES, B.D.; PENNER, J.L. Urease activity of *Proteus penneri*. **J. Clin. Microbiol.** v. 25, p. 2302-2305, 1987.

MOBLEY, H.; WARREN, J. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. **J. Clin. Microbiol.** v. 25, p. 2216-2217, 1987.

MORGAN, D.R. et al. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. **Infect. Immun.** v. 50, p. 62-65, 1985.

MUSHER, D.M. et al. Role of urease in pyelonephritis resulting from urinary tract infection with *Proteus*. **J. Infect. Dis.** v. 131, p. 177-181, 1975.

NICHOLSON, E.B. et al. *Proteus mirabilis* urease transcriptional regulation by UreR. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 465-473, 1993.

NIEL-WEISE, B.S.; VAN DEN BROEK, P.J. Urinary catheter policies for long-term bladder drainage. **Cochrane Database Syst. Rev.** 1:CD004201, 2005.

ORENSTEIN, R.D.O.; WONG, E.M.D. Urinary tract infections in adults. **American Farm. Physician.** vol. 1, 1999.

PEERBOOMS, P.G.; VERWEIJ, A.M.; MACLAREN, D.M. Vero cell invasiveness of *Proteus mirabilis*. **Infect. Immun.** v. 43, p. 1068-1071, 1984.

REID, G.; SOBEL, J. D. Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infections: a review. **Rev. Infect. Dis.** v. 9, p. 470-487, 1987.

RICCETTO, C. L. Z. **Infecções do trato urinário - Síndromes clínicas e princípios do tratamento.** 2004. Disponível em: <http://www.fcm.unicamp.br/deptos/urologia/graduacao/pdf/ITU_Sindromes_Clinicas.pdf>. Acesso em: 17 Março 2011.

ROCHA, S.P. et al. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 51, p. 319-326, 2007a.

ROCHA, S.P.; PELAYO, J.S.; ELIAS, W.P. Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 51, p. 1-7, 2007b.

RODMAN, J.S. Struvite stones. **Nephron.** v. 81, p. 50-59, 1998.

RÓZALSKI, A.; SIDORCZYK, Z.; KOTELKO, K. Potencial virulence factors of *Proteus bacilli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 61, p. 65-89, 1997.

ROWE, G.E.; WELCH, R. A. Assays of hemolytic toxins. **Meth. Enzymol.** v. 235, p. 657-667, 1994.

SAVOIA, D. et al. Adhesion of *Proteus* species to various cell types. **Eur. J. Clin. Microbiol.** v. 2, p. 571-576, 1983.

SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.**, v. 60, p. 167-215, 1996.

SENIOR, B.; HUGHES, C. Production and properties of haemolysins from clinical isolates of *Proteaeae*. **J. Med. Microbiol.** v. 24, p. 15-25, 1987.

SILVA, M.R.L.; PELAYO, J.S. **Caracterização genética e fenotípica de fatores de virulência de *Proteus mirabilis* uropatogênico isolados na região de Londrina-Pr.** Dissertação apresentada ao programa de Mestrado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina. 46f, 2003.

SIMI, S. **Caracterização físico-química e biológica de uma hemolisina de baixo peso molecular produzida por linhagem clínica de *Enterobacter cloacae*.** Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na área de Microbiologia. 87f, 2004.

SMITH, H.W. The haemolysins of *Escherichia coli*. **J Path Bacteriol.** v. 85, p. 197-211, 1963.

STAMM, W.E.; HOOTON, T.M. Management of urinary tract infections in adults. **N. Engl. J. Med.** v. 329, p. 1328-1334, 1993.

STICKLER, D.J.; ZIMAKOFF, J. Complications of urinary tract infections associated with devices used for long-term bladder management. **J. Hosp. Infect.** v. 28, p. 177-194, 1994.

SWIHART, K.; WELCH, R. Cytotoxic activity of the *Proteus* hemolysin HpmA. **Infect. Immun.** v. 58, p. 1861-1869, 1990.

TRABULSI, L.R.; ALBERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008, 760p.

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

WARREN, J. et al. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Infectious Diseases Society of America (IDSA). **Clin. Infect. Dis.** v. 29, p. 745-758, 1999.

WELCH, R.A. Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. **Mol. Microbiol.** v. 5, p. 521-529, 1991.

WELCH, R.A. Identification of two different hemolysins determinants in uropathogenic *Proteus* isolates. **Infect. Immun.** v. 55, p. 2183-2190, 1987.

ZUNINO, P.; PICCINI, C.; LEGNANI-FAJARDO, C. Growth, cellular differentiation and virulence factor expression by *Proteus mirabilis* in vitro and in vivo. **J. Med. Microbiol.** v. 48, p. 527-534, 1999.

4 OBJETIVO GERAL

Detectar os genes e verificar a expressão de hemolisinas em 211 isolados uropatogênicos de *Proteus mirabilis*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a presença dos genes *hpmA* e *hpmB* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Dot Blot;
- Verificar a presença do gene *hlyA* por PCR;
- Verificar a expressão dos genes *hpmA* e *hpmB* pela técnica RT-PCR;
- Realizar o sequenciamento dos genes *hpmA* e *hpmB* de 2 isolados de *P. mirabilis*.

ARTIGO

Molecular detection of HpmA and HlyA hemolysin of uropathogenic *Proteus mirabilis*

Silvia Emanoele Cestari¹, Marilucia Santos Ludovico¹, Fernando Henrique Martins¹,
Sérgio Paulo Dejato da Rocha¹, Waldir Pereira Elias², Jacinta Sanchez Pelayo^{1*}

ABSTRACT

Urinary tract infection (UTI) is one of the bacterial infections frequently documented in humans. *Proteus mirabilis* is associated with UTI mainly in individuals with urinary tract abnormality or related with vesicular catheterism and it can be difficult to treat because of the formation of stones in the bladder and kidneys. These stones are formed due to the presence of urease synthesized by the bacteria. Another important factor is that *P. mirabilis* produces hemolysin HpmA, used by the bacteria to damage the kidney tissues. *Proteus* spp. samples can also express HlyA hemolysin, similar to that found in *Escherichia coli*. A total of 211 uropathogenic *P. mirabilis* isolates were analyzed to detect the presence of the *hpmA* and *hpmB* genes by the techniques of polymerase chain reaction (PCR) and dot blot and *hlyA* by PCR. The *hpmA* and *hpmB* genes were expressed by the RT-PCR technique and two *P. mirabilis* isolates were sequenced for the *hpmA* and *hpmB* genes. The presence of the *hpmA* and *hpmB* genes was confirmed by PCR in 205 (97.15%) of the 211 isolates. The dot blot confirmed the presence of the *hpmA* and *hpmB* genes in the isolates that did not amplify in the PCR. None of the isolates studied presented the *hlyA* gene. The *hpmA* and *hpmB* genes that were sequenced presented 98% identity with the same genes of the HI4320 *P. mirabilis* sample. This study showed that the PCR technique has good sensitivity for detecting the *hpmA* and *hpmB* genes of *P. mirabilis*.

Keywords: *Proteus mirabilis*. Urinary tract infection. Hemolysin. PCR. Dot Blot. RT-PCR.

Introduction

Proteus mirabilis is considered an important infectious agent of infections acquired both in the community and the hospital environment [5]. Urinary tract infections (UTI) caused by this microorganism can be divided into two

¹ Departamento de Microbiologia, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

² Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

Corresponding author: Jacinta S. Pelayo, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Cx. P. 6001, 86051-970, Fax: +55 (43) 3371-4494, Londrina, PR, Brazil (e-mail: jspelayo@gmail.com)

categories, systemic or hematogenic, and ascendant that colonizes the whole urinary tract (from the urethra to the kidneys) which most frequently infects patients with long-term urinary catheters or with anatomic anomalies in the urinary tract [13, 21].

P. mirabilis is the third most common cause (after *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*) of the UTI, but it is the most serious because it causes damage such as catheter obstruction, stone formation in the bladder and kidneys, cystitis, acute and chronic pyelonephritis and bacteremia [9, 12]. *P. mirabilis* infections are characterized as long term and difficult to treat and can often lead to death due to the capacity of this microorganism to mediate urea hydrolysis, via the urease it produces, causing tissue necrosis and inflammation at the infection site, so that the pathogen is inaccessible to antibiotics [2, 13, 16].

Several pathogenicity factors and morphological characteristics are expressed by *P. mirabilis*, such as fimbria, flagellum, capsules, enzymes (urease, proteases and deaminase amino acid), toxins (hemolysins, proteus toxic agglutinin (Pta) and endotoxins) that explain the difficulty in obtaining success in clinical therapy [1, 13, 17].

The hemolytic activity produced by *P. mirabilis* is associated to hemolysin HpmA. This hemolysin is associated to the cell, calcium-independent, former of pores, codified by two genes, *hpmA* and *hpmB*, that codify the HpmA (166 kDa) and HpmB (63 kDa) proteins, respectively [5, 19]. HpmA hemolysin is responsible for tissue damage and is activated when its N-terminal peptide is cleaved, resulting in active HpmA (140 kDa), and HpmB is responsible for HpmA activation and transport [19].

Evidence suggests a correlation between the hemolytic activity and the invasive and cytotoxic capacity in the Vero cells (African green monkey kidney) by *P. mirabilis*, increasing the virulence of the infections [55, 18]. Swihart and Welch [18] confirmed that hemolytic and cytotoxic activity are due to the production of active hemolysin HpmA, using mutant isolates (HpmA negative) that lose both the hemolytic and cytotoxic capacity in human cells (epithelial, monocyte) and in Vero cells.

Swihart and Welch [18] detected the presence of HpmA in most of the *P. mirabilis* isolates that they studied. Most (97%) of the *P. mirabilis* isolates studied by these researchers came from UTI, suggesting that HpmA is the predominant hemolysin in *Proteus* spp. and may play an important role in UTI caused

by this microorganism. These authors also observed that some *Proteus* spp. samples can express hemolysin HlyA similar to that of *E. coli*.

It is essential to control *P. mirabilis* in the hospital environment due to its growing importance both as an infectious agent that is difficult to eradicate and as a microorganism that may produce expanded spectrum β -lactamases [13, 16].

Hemolysin HpmA production is considered an important virulence factor of uropathogenic *P. mirabilis*. Thus it is important to detect the genes and verify hemolysin expression in a collection of uropathogenic *P. mirabilis*.

Materials and Methods

Bacteria used

A total of 211 *P. mirabilis* strains were used isolated from patients with urinary tract infection (UTI) from the University hospitals in the cities of Ribeirão Preto-SP and Londrina-PR, Brazil, from 2000 to 2009. The wild HI4320 *P. mirabilis* strain [9] was used as positive control in the tests and the *E. coli* DH5 α strain was used as negative control in the dot blot experiments. The samples were kept at -80°C in Brain Heart Infusion broth (BHI) (Difco, USA) with 20% glycerol.

Detection of genes that codify the hemolysins HlyA/HpmA by polymerase chain reaction (PCR)

The PCR technique was used to detect the *hpmA*, *hpmB* (multiplex PCR) and *hlyA* genes. The bacterial DNA was extracted following methodology by Albright et al [3]. The reaction consisted of a mix of each nucleotide (10 pmol); Taq DNA polymerase (1.5 U) (Invitrogen, USA); PCR buffer (1X); dATP, dCTP, dGTP and dTTP (0.2 mM each), MgCl₂ (2.5 mM) and ultrapure water (Milli-Q Millipore) sterilized to 25 μ l final volume. Table 1 shows the initiating nucleotide sequences and amplified fragment sizes.

Detection of hemolysin HpmA/HpmB codifying genes by the Dot Blot test

For the Dot Blot test, the genomic DNA was extracted using the *Illustra bacteria genomic Prep mini spin* (GE Healthcare). The probes were obtained by PCR, as described previously, using the genomic DNA of the HI4320 sample as pattern. The amplified products were marked using the *ECL nucleic acid labeling and detection system* (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions. The genomic DNA from each sample was transferred, using the *Hoefler vacuum system* (GE Healthcare), to a positively charged nylon membrane (GE Healthcare). The hybridization reactions were carried out with the *ECL nucleic acid labeling and detection system* kit (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions.

Partial sequencing of the *hpmA* and *hpmB* genes.

The *hpmA* and *hpmB* genes of the PM02HU and PM167HU strains (selected randomly) of the present study were partially sequenced using the primer described in Table 1. The sequencing reactions were carried out in the Center for Human Genome Studies of the Bioscience Institute at the University of São Paulo, Brazil. The DNA sense band was sequenced in triplicate for all the isolates. The *MegaBACE 1000* automatic sequencer was used (Amersham Pharmacia Biotech, USA) and the sequencing reactions were carried out according to the manufacturer's protocol, using the *APBiotech DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* kit, the *Thermo SequenaseTM II DNA Polymerase* enzyme and the primer. The sequences obtained for each one of the isolates were aligned using the Bioedit program and were compared with the sequences listed in the *EMBL/GenBank* using the *Blastn* program of the wild *P. mirabilis* HI4320 strain.

Expression of hemolysin HpmA by the RT-PCR technique in *P. mirabilis* clinical isolates

Seventeen of the 211 *P. mirabilis* isolates were selected randomly (PM11HU, PM36HU, PM49HU, PM53HU, PM58HU, PM64HU, PM87HU, PM99HU, PM108HU, PM114HU, PM159HU, PM166HU, PM171H, PM179HU, PM222HU, PM228HU and PM245HU) and were used to determine the expression of hemolysin

HpmA. The presence of the gene was determined previously by amplification in PCR using the primers described in Table 1. Each isolate was cultured individually in buffered BHI under agitation (10,000 x *g*) at 37°C for 18 h to promote high HpmA expression [10]. The RNA was extracted from each culture using the RNeasy kit (Qiagen, France) and possible DNAs were digested with DNase I (Invitrogen, USA). After digestion, the cDNA was synthesized using the SuperScript first-stand synthesis system for RT-PCR kit (Qiagen, France). HpmA expression was determined for each isolate by the RT-PCR technique using cDNA as template and the HpmA and HpmB primers. The *rpoA* gene, codified by RNA polymerase A (Invitrogen, USA) was used as control expression.

Results

Of the 211 isolates studied, 205 (96.24%) presented amplification for the *hpmA* and *hpmB* genes by PCR. No isolate presented amplification for the *hlyA* gene.

The genes of the PM03, PM04, PM61, PM146, PM160 and PM212 isolates that did not present amplification in the PCR trials (*hpmA* and *hpmB*), had their presence confirmed by the dot blot (data not shown).

The *hpmA* and *hpmB* genes were sequenced and aligned with the respective genes of the wild HI4320 strain (NCBI GenBank Number NC_010554.1). Samples PM02 and PM167 presented 98% identity for *hpmA* and *hpmB* compared to the same genes of the HI4320 strain. When the two samples of the present study were compared there was 100% identity among the genes (data not shown).

The expression of the *hpmA* and *hpmB* genes of the *P. mirabilis* isolates was confirmed by RT-PCR (Figure 1).

Discussion

Most of the infections in the urinary tract caused by *P. mirabilis* are characterized as long term and difficult to treat [16]. This microorganism generally develops an ascendant route with colonization of the urethra, passing to the bladder and ascending the urether to the kidneys, where it can cause cystitis, pyelonephritis and stone formation in the bladder and kidneys [11, 20]. The damage caused to the

tissues and the kidney invasion are produced and mediated by the cytotoxins hemolysin HpmA, urease and Pta [1, 10, 22].

Some *Proteus* spp. samples can express the hemolysin HlyA of *E. coli* [18]. Therefore it was decided to verify the presence of this toxin in uropathogenic *P. mirabilis* samples, but none of the strains studied presented amplification for the HlyA gene, indicating that this hemolysin is not prevalent in uropathogenic *P. mirabilis*.

Hemolysin HpmA acts as a potent cytolysin against HRPTEC kidney cells (human renal proximal tubular epithelial cells) and Vero cells [11]. With the sequencing of the genome of the uropathogenic HI4320 *P. mirabilis* genome, it was observed that this hemolysin consists of two genes, *hpmA* and *hpmB* genes [13].

In the present study the *hpmA/hpmB* genes were researched in *P. mirabilis* by PCR and dot blot, where all the isolates presented the *hpmA* and *hpmB* genes. The presence of the *hpmB* gene in the isolates that had the *hpmA* gene was in line with the descriptions by Uphoff and Welch [19] and Lukomski et al. [8] who showed the need to cleave the N-terminal peptide of the HpmA by HpmB to activate and transport the hemolytic HpmA protein to outside the cell.

The sequencing of the *hpmA* and *hpmB* genes, carried out in two *P. mirabilis* isolates, was compared with the same genes from the standard *P. mirabilis* HI4320 sample, showing great similarity (98%) and 100% identity among the isolate identities (data not shown). These results corroborated those reported by Fraser et al [6] who described the HpmB/A locus that codifies hemolysin HpmA as a well-conserved region in *P. mirabilis* isolates.

Hemolysin HpmA was found in all the isolates tested in the expression tests using RT-PCR. This suggests that HpmA is a factor in the pathogenesis of *P. mirabilis* samples isolated from human urine.

There is evidence that hemolysin increases the virulence of infections by *P. mirabilis* because production of this protein has been correlated with cytotoxicity in Vero cells [18]. Studies by Peerbooms et al. [15] demonstrated a direct correlation between the ability of *P. mirabilis* to invade Vero cells and produce hemolytic activity. The increase in hemolysin HpmA production is coordinately regulated during the cell differentiation for the swarmer form and during infection, and is correlated with the invasiveness of *P. mirabilis* strains [4, 6, 17]. Synthesis and

secretion of hemolysin with hemolytic activity is approximately 20 times higher in hyperflagellate swarmer cells than in swimmer cells [4].

Peerbooms et al. [14] observed that *P. mirabilis* that produced hemolysin associated to the cell produced a lethal dose 50% greater than the non-hemolytic isolates when injected transurethrally in mice. The same researchers later demonstrated that hemolytic activity in *P. mirabilis* was related to cell invasion, when they observed that internalization in Vero cells increased proportionally with the hemolytic titer of the bacterial sample [15].

Hemolysin HpmA produced by *P. mirabilis* is considered a very important virulence factor but its precise contribution to *P. mirabilis* virulence has not yet been elucidated [10, 15]. Although it is not considered essential during the initial infection stages, it is important in the final stages when the bacteria are already colonizing the kidneys [23]. Detecting and characterizing *P. mirabilis* hemolysin HpmA is necessary to elucidate its importance as a virulence factor, in addition to its possible relationship with other factors produced by *P. mirabilis* that together contribute to cytotoxicity in the UTI in humans.

In the present study, the hemolysin HpmA was searched in 211 *P. mirabilis* isolates originating from urinary infections in hospital patients. To our knowledge, this is the first study that uses the PCR, dot blot and RT-PCR techniques on a large collection of pathogenic *P. mirabilis* to detect this toxin. These techniques were shown to be precise and useful to detect this virulence factor of uropathogenic *P. mirabilis*.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brazil).

References

1. Alamuri P, Mobley HL (2008) A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. Mol Microbiol 68: 997–1017

2. Alamuri P, Eaton KA, Himpsl SD, Smith SN, Mobley HL (2009) Vaccination with *Proteus* toxic agglutinin, a hemolysin-independent cytotoxin in vivo, protects against *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Infect Immun* 77: 632-641
3. Albright LM, Huala E, Ausubel FM (1989) Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annu Rev Genet* 23: 311–336
4. Allison C, Lai HC, Hughes C (1992) Co-ordinate expression of virulence genes during swarm-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. *Mol Microbiol* 6:1583–1591
5. Coker C, Poore C, Li X, Mobley HL (2000) Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microb Infect* 2: 1497–1505
6. Fraser GM, Claret L, Furness R, Gupta S, Hughes C (2002) Swarming-coupled expression of the *Proteus mirabilis* *hpmBA* haemolysin operon. *Microbiology* 148: 2191–2201
7. Johnson JR, Stell AL (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 181: 261–272
8. Lukomski S, Serwecinska L, Rózalski A, Dziadek J, Staczek P, Jaworski A (1991) Cell-free and cell bound haemolytic activities of *Proteus penneri* determined by different Hly determinants. *Can J Microbiol* 37: 419–424
9. Mobley HL, Warren J (1987) Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. *J Clin Microbiol* 25: 2216–2217
10. Mobley HL, Chippendale G (1990) Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. *J Infect Dis* 161: 525–530
11. Mobley HL, Chippendale GN, Swihart KG, Welch RA (1991) Citotoxicity of the HpmA hemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular epithelial cells. *Infect Immun* 59: 2036–2042

12. Niel-Weise BS, Van Den Broek PJ (2005) Urinary catheter policies for long-term bladder drainage. *Cochrane Database Syst. Rev* 1: CD004201
13. Pearson MM, Sebahia M, Churcher C, Quail MA., Seshasayee AS, Luscombe NM, Abdellah Z, Arrosmith C, Atkin B, Chillingworth T, Hauser H, Mobley HL et al (2008) Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *J Bacteriol* 190: 4027–4037
14. Peerbooms PG, Verweij AM, MacLaren DM (1983) Investigation of the haemolytic activity of *Proteus mirabilis* strains. *Anton Van Leeuw* 49: 1–11
15. Peerbooms PG, Verweij AM, MacLaren DM (1984) Vero cell invasiveness of *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* 43: 1068–1071
16. Penner JL (1992) The genera *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. In A Balows, H G Trüper, W Harder, KH Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. III, p. 2849–2853 Springer-Verlag KG, Berlin, Germany
17. Rózalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K (1997) Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 65–89
18. Swihart K, Welch R (1990) Cytotoxic activity of the *Proteus* hemolysin HpmA. *Infect Immun* 58: 1861–1869
19. Uphoff T, Welch R (1990) Nucleotide sequencing of the *Proteus mirabilis* calcium independent hemolysin genes (*hpmA* and *hpmB*) reveals sequence similarity with *Serratia marcescens* hemolysin genes (*shIA* and *shIB*). *J Bacteriol* 172: 1206–1216
20. Warren JW, Muncie HL, Hall-Craggs JR M (1988) Acute pyelonephritis associated with bacteriuria during long-term catheterization: a prospective clinicopathological study. *J Infect Dis* 158, 1341–1346
21. Warren JW (1996) Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. In H. L. T. Mobley and J. W. Warren (ed.), *Urinary tract infections. Molecular pathogenesis and clinical management*. ASM Press, Washington, D.C., p. 3–27

22. Welch RA (1991) Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 5: 521–528
23. Zunino P, Piccini C, Legnani-Fajardo C (1999) Growth, cellular differentiation and virulence factor expression by *Proteus mirabilis* in vitro and in vivo. *J Med Microbiol* 48: 527–534

Table 1 - Sequence of the primers used

Target Gene	Sequence (5' - 3')	Amplicon size (bp)	Annealing temp. (°C)	References
<i>hpm A</i>	(F)GTTGAGGGGCGTTATCAAGA GTC	709	55 °C	In this work
	(R)GATAACTGTTTTGCCCTTTTG TGC			
<i>hpm B</i>	(F)CAGTGGATTAAGCGCAAATG (R)CCTTCAATACGTTCAACAAAC	422	55 °C	In this work
	C			
<i>rpoA</i>	(F)GATCATGGCTCAGATTGAAC (R)TGCGGGTAACGTCAATTGAC	456	58°C	In this work
<i>hlyA</i>	(F)AACAAAGGATAAGCACTGTTC TGGCT (R)ACCATATAAGCGGTCATTCC CGTCA	1177	63 °C	[7]

Fonte: foward, R: reverse.

Fig 1 -Expression of *hpmA* and *hpmB* in uropathogenic *P. mirabilis* samples by RT-PCR. The cDNA of each sample were used in the amplification reaction. The *rpoA* gene was used as expression control. The specific primers are listed in Table 1. Wells (-), were not activated by reverse transcriptase. Wells (+) with reverse transcriptase addition. Sizes (in kb) are shown on the right-hand side.

