



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SÉRGIO PAULO DEJATO DA ROCHA

**PARTICIPAÇÃO DA FÍMBRIA MR/P DE *Proteus mirabilis*
UROPATOGÊNICO NO MODELO DE ADESÃO
AGREGATIVA EM CÉLULAS HEp-2**

LONDRINA
2005

SÉRGIO PAULO DEJATO DA ROCHA

**PARTICIPAÇÃO DA FÍMBRIA MR/P DE *Proteus mirabilis*
UROPATOGÊNICO NO MODELO DE ADESÃO
AGREGATIVA EM CÉLULAS HEP-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia sob orientação da Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo.

LONDRINA
2005

SÉRGIO PAULO DEJATO DA ROCHA

**PARTICIPAÇÃO DA FÍMBRIA MR/P DE *Proteus mirabilis*
UROPATOGÊNICO NO MODELO DE ADESÃO
AGREGATIVA EM CÉLULAS HEp-2**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina, 19 de dezembro de 2005

DEDICATÓRIA

Aos meus pais WILSON E MARIA CÉLIA, que nunca mediram esforços para me proporcionar uma educação de qualidade sendo assim um exemplo de vida, e aos meus queridos irmãos MIRELLA E WILSON pela amizade e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Jacinta Sanchez Pelayo**, pela orientação, incentivos, ensinamentos, paciência, compreensão e confiança desde o primeiro dia que cheguei ao laboratório, mas, sobretudo pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Jr.** co-orientador deste trabalho, pelo recebimento de braços abertos, laboratório, paciência, dicas, compreensão e amizade.

À **Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis**, pelo laboratório, paciência, dicas, amizade e apoio.

À **Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza**, pelo laboratório, colaboração e sugestões na parte imunológica e, principalmente, pela amizade.

Ao **Prof. Dr. Carlos Nozawa e Profa Dra Rosa Elisa Linhares** pela amizade e contribuição nos testes com cultura de células.

Ao **Prof. Dr. Emerson Venancio e Profa. Dra. Márcia Furlaneto** pela ajuda na elaboração do plano e amizade.

Aos pesquisadores do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan **Dra. Márcia Franzolin, Dra. Marta Domingos, Dr. Osvaldo Santana e Dr. Marcelo Sircili**, por toda colaboração, sugestões e amizade.

À **Dra. Aurora Marques Cianciarullo** do Laboratório de Genética do Instituto Butantan por todo auxílio nos experimentos de microscopia eletrônica.

À minha pequena grande amiga **Júlia Mítico**, pela valiosa ajuda nos experimentos imunológicos, amizade e risadas.

Aos meus velhos amigos de bancada e companheiros **Carlos Alfredo, Kathelin, Cláudia, Ariane, Vanderlei, Eliana e Ligiane**, pela colaboração, amizade e risadas.

Aos meus mais novos amigos de bancada e companheiros **Bianca, Vanessa, Renato, Maurílio, Júlia, Márcio, Carol, Letícia, Eliana e Luciana**, pela agradável recepção, colaboração, amizade e risadas.

Aos meus amigos de pós-graduação, balada e Lado “B” **Narjara, Tatiana, Jesiane, Ligia, Raíssa e Fabrício**, pelo companheirismo, incentivo e agradável convívio durante todos esses anos.

Aos amigos **Paulo e Viviam**, pela colaboração nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão e amizade.

As secretárias e grandes amigas sempre eficientes **Nadja e Maria Luiza** pelo auxílio e apoio constantes.

Aos funcionários da Universidade Estadual de Londrina **Claci, Iara, Marta, “Val” e Rosilda** pela vontade e ajuda.

Aos funcionários do Instituto Butantan **Sebastiana, Édson, Gisélia, Reginaldo, Regina e Márcia** pela vontade e ajuda.

À **Michele Sakamoto**, pela amizade, paciência e pelo companheirismo de boa parte da minha vida e deste trabalho.

Ao meu primo **Renato Travagin** pela paciência, amizade, risadas e por ter me agüentado todo tempo em que fiquei em São Paulo.

Aos **Docentes do Programa**, pelo conhecimento transmitido direta e indiretamente.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À toda minha família, cujo desprendimento e sacrifício propiciaram a conclusão de mais esta etapa da minha vida.

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

PENSAMENTO

Quem espera que a vida
Seja feita de ilusão
Pode até ficar maluco
Ou morrer na solidão
É preciso ter cuidado
Pra mais tarde não sofrer
É preciso saber viver
Toda pedra no caminho
Você pode retirar
Numa flor que tem espinhos
Você pode se arranhar
Se o bem e o mal existem
Você pode escolher
É preciso saber viver

Roberto Carlos e Erasmo Carlos

RESUMO

Proteus mirabilis é um dos mais importantes causadores de infecção do trato urinário (ITU). Neste trabalho foram estudadas 35 amostras de *P. mirabilis* isolados de ITU em Londrina-PR, as quais foram examinadas o modelo de adesão em células HEp-2 e a capacidade de formação do biofilme em poliestireno. Todas as amostras apresentaram adesão agregativa (AA) após 6 horas e foram capazes de formar biofilme. A fímbria manose-resistente *Proteus-like* (MR/P), fímbria tipo 1 de *Escherichia coli* (TIF) e as fímbrias de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) AAF/I, II e III, foram pesquisadas através de seus respectivos genes, bem como o fragmento sonda de EAEC. Os genes *mrpA* e *mrpH* da fímbria MR/P, foram detectados em todas as amostras. A expressão da fímbria MR/P foi detectada através da hemaglutinação de eritrócitos de galináceo em todas as amostras. Já, nenhuma outra seqüência gênica pesquisada foi encontrada, indicando a presença de uma distinta adesina agregativa que medeia a AA e a formação do biofilme em *P. mirabilis*. Para caracterizar o envolvimento da fímbria MR/P no estabelecimento da AA nessas amostras, uma mutação não polar foi realizada no gene *mrpA* da amostra *P. mirabilis* UEL-13. A análise fenotípica demonstrou que a fímbria MR/P está envolvida na AA em células HEp-2, bem como na formação do biofilme. Entretanto, estes fenótipos são multifatoriais, pois, a mutação não aboliu ambos fenótipos completamente. Nossos resultados sugerem que padrão AA de *P. mirabilis* está associado com a expressão da fímbria MR/P, sendo esta característica associada com formação de biofilme, o qual pode ser um importante passo no estabelecimento da ITU em pessoas cateterizadas.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1. INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO	10
1.2. PROTEUS MIRABILIS	11
1.3. ADESINAS FIMBRIAS.....	12
1.3.1. Fímbria não-aglutinante (NAF)	12
1.3.2. Fímbria Proteus mirabilis (PMF)	13
1.3.3. Fímbria temperatura-ambiente (ATF)	14
1.3.4. Manose-resistente Proteus-like (MR/P).....	15
1.3.5. Fímbria manose sensível	17
1.4. ADESÃO AGREGATIVA.....	18
1.5. BIOFIME	19
2 OBJETIVO	21
3 REFERÊNCIAS	22
4 TRABALHO CIENTÍFICO: THE MR/P FIMBRIAE OF UROPATHOGENIC PROTEUS MIRABILIS IS INVOLVED IN THE AGGREGATIVE ADHERENCE TO HEP-2 CELLS	26
5 CONCLUSÕES	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO (ITU)

O trato urinário está susceptível a infecções por microrganismos patógenos exógenos ao trato urinário, incluindo espécies bacterianas que com seus específicos fatores de virulência o colonizam (Li e Mobley, 2002).

A ITU ocorre através de uma rota ascendente. O microrganismo de origem fecal coloniza a região peri-uretral entra na bexiga onde então se multiplica. Ele pode manter-se neste local ou, ascender, através dos ureteres, até os rins. Algumas cepas mais virulentas podem invadir a corrente sangüínea e causar uma infecção sistêmica (Li e Mobley, 2002).

O trato urinário é um dos sítios mais comum de infecção bacteriana em humanos. Caracteriza-se fundamentalmente pela multiplicação de bactérias em qualquer parte do trato urinário. Indivíduos com alto risco para ITU incluem neonatos, mulheres sexualmente ativas e homens e mulheres que estejam utilizando cateter uretral (Mobley, 2000).

A ITU pode causar tanto cistite quanto pielonefrite. O termo cistite é usado para descrever uma síndrome envolvendo disúria, inflamação com infiltração de leucócitos que pode ser provocada por uma 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).

1.2 *PROTEUS MIRABILIS*

Hauser em 1885 foi quem descobriu esse gênero e nomeou de *Proteus* por causa do personagem Proteus do livro Odisséia de Homero, esse personagem tinha o poder de assumir diferentes formas para escapar de ser questionado (Mobley e Belas, 1995).

P. mirabilis é uma bactéria móvel, dimórfica, Gram-negativa, pertencente à Família Enterobacteriaceae. É encontrado no intestino de humanos e animais, no solo e água poluída (Coker *et al.*, 2000). Esse microrganismo possui vários fatores de virulência que são importantes na ITU, incluindo a adesão ao uroepitélio mediada por fímbrias (Bahrani *et al.*, 1994), produção de urease (Coker *et al.*, 2000), invasão da célula eucariótica (Peerbooms *et al.*, 1984), quebra de IgG e IgA por enzimas proteolíticas (Coker *et al.*, 2000), produção de hemolisina (Welch, 1987) e motilidade do tipo *swarming* (Coker *et al.*, 2000).

Escherichia coli é o microrganismo mais comum nas ITU em pessoas com o trato urinário normal. *P. mirabilis* é encontrado, freqüentemente, em indivíduos com anormalidade estrutural do trato urinário ou que estejam utilizando cateter urinário (Mobley, 2000). *P. mirabilis* pode causar sérios danos no trato urinário como: cistite, pielonefrite aguda e cálculos, podendo até causar bacteremia (Zunino *et al.*, 2001).

1.3 ADESINAS FIMBRIAIS

Dentre os fatores de virulência apresentados por *P. mirabilis* a adesão à superfície da mucosa do hospedeiro está entre os mais importantes (Coker *et al.*, 2000). 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, influencia a susceptibilidade do indivíduo a tais infecções (Daifuku e Stamm, 1986).

Fímbrias são apêndices proteináceos que variam no tamanho e diâmetro, consistindo de um polímero com uma subunidade protéica adesiva na extremidade ou intercalado por várias destas subunidades, que projetam-se da célula bacteriana (Edwards e Puente, 1998).

P. mirabilis pode simultaneamente expressar diferentes tipos de fímbrias que podem contribuir para a colonização do trato urinário através da específica adesão a receptores no uroepitélio, fímbria não aglutinante (NAF), fímbria *P. mirabilis* (PMF), fímbria temperatura ambiente (ATF) e Manose-resistente/*Proteus*-like (MR/P) (Pellegrino *et al.*, 2003).

1.3.1 Fímbria não aglutinante (NAF)

A NAF foi isolada e identificada em *P. mirabilis* uropatogênico e inicialmente denominada como uma adesina de célula uroepitelial (UCA) (4 a 6 nm, flexível, tubular). Wray *et al.* (1986), reportaram que a NAF liga-se eficientemente às células renais epiteliais e às células exfoliadas coletadas na urina humana.

Bijlsma *et al.* (1995), reportaram que o gene *ucaA*, que codifica a maior subunidade estrutural da fímbria, é composto por 540 pb e codifica um polipeptídeo de 180 aminoácidos e de massa molecular de 16 kDa. Usando sonda para o gene *ucaA* verificaram que todos os isolados de *P. mirabilis* testados apresentaram o gene.

O nome fímbria não-aglutinante foi proposto para substituir adesina de célula uroepitelial (UCA) para distinguí-la das outras adesinas fimbriais expressas por *P. mirabilis* (Tolson *et al.*,1997).

Latta *et al.* (1998), testando a expressão de NAF em diferentes condições, verificou que a sua melhor expressão dá-se na presença de ágar Lúria contendo 2% de àgar, adicionado de 0,5% de glicose, incubados a 22°C por 48 horas. Também verificou que os isolados testados crescidos sob diferentes condições foram aptos a aderir e invadir células EJ/28 (tumor de trato urinário).

Tolson *et al.* (1995), estudando amostra de *P. mirabilis*, crescidas em condições ideais de expressão da fímbria NAF, verificaram que a amostra foi capaz de aderir em células HEP-2 *in vitro* e que a adesão foi significativamente eliminada com a pré incubação de anticorpo monoclonal anti-NAF.

1.3.2 Fímbria *Proteus mirabilis* (PMF)

Bahrani *et al.* (1993), reportaram o isolamento e seqüenciamento do gene *pmfA* relacionado com a PMF como sendo uma seqüência de 552 pb cujo produto é um polipeptídeo de 184 aminoácidos.

Mobley (1996), descreveu a organização genética do *cluster* responsável pela expressão da fímbria PMF como sendo composto por cinco genes que codificam os seguintes polipeptídeos: PmfA com 18,9 kDa, PmfC com 93,1 kDa, PmfD com 28,2 kDa, PmfE com 38,9 kDa e PmfF com 19,7 kDa.

Massad *et al.* (1994b), testaram um mutante *pmfA* no modelo animal de infecção transuretral em camundongos da linhagem CBA . Verificaram que houve uma queda significativa na capacidade do mutante de colonizar a bexiga (83 vezes menor) quando comparado com o fenótipo selvagem, enquanto nos rins a capacidade de colonização do mutante foi semelhante à cepa selvagem. Dessa forma, propôs-se que a PMF tem papel importante na colonização da bexiga, mas não na colonização dos rins.

Zunino *et al.* (2003), testaram um mutante *pmfA* em camundongos CD-1 como modelo animal de infecção transuretral e via hematogênica. Verificaram que houve colonização tanto no rim quanto na bexiga em ambas as vias de infecção.

A contradição dos resultados dos trabalhos citados acima deve-se ao fato de que ambos utilizaram linhagens de camundongos diferentes, já que Massad *et al.* (1994b) utilizaram a linhagem CBA e Zunino *et al.* (2003) a linhagem CD-1 além de também utilizarem a via hematogênica.

1.3.3 Fímbria Temperatura Ambiente (ATF)

Massad *et al.* (1994a), purificaram e caracterizaram a fímbria ATF. Verificaram que a sua subunidade maior (24 kDa) não apresentou similaridade com

nenhuma outra fímbria ou proteína. Através da microscopia eletrônica verificou-se que era formada por uma estrutura tubular na superfície da bactéria reconhecida por anti-soro específico, mas não relacionada com hemaglutinação. As condições de crescimento influenciam sua expressão. Verificou-se que a sua expressão dá-se em Caldo Lúria a 23°C por 48 horas, sem aeração.

A seqüência parcial de dois polipeptídeos foi determinada por Mobley (1996): AtfA com 19 kDa sendo uma subunidade estrutural e AtfB sendo uma chaperonina-like. Esta fímbria foi relacionada com o crescimento de *Proteus* spp no ambiente.

Zunino *et al.* (2000), verificaram em estudo com mutante *atfA*, que a amostra mutante foi capaz de colonizar o trato urinário na mesma proporção que a amostra selvagem. Estes dados sugerem que ATF não tem papel na infecção do trato urinário por *P. mirabilis*.

1.3.4 Manose-resistente *Proteus*-like (MR/P)

Entre as fímbrias relacionadas com *P. mirabilis*, a MR/P é a melhor estudada. Caracteriza-se como uma fímbria do tipo IV de 07 a 08 nm de diâmetro observada pela primeira vez em bactérias capazes de aglutinar eritrócitos na presença de manose (Old e Adegbola, 1982).

O operon *mrp*, responsável pela codificação da fímbria MR/P, é composto de duas regiões: *mrpABCDEFGHJ* e *mrpI*. *mrpABCDEFGHJ* codifica oito proteínas estruturais (MrpA,B,C,D,E,F,G,H) e uma proteína ligadora de DNA, MrpJ, reguladora transcripcional do operon flagelar. A proteína MrpA é a maior subunidade

estrutural, MrpB âncora a fímbria na célula, MrpC é o usher da fímbria, MrpD é a chaperonina, MrpE liga a adesina à fímbria, MrpF e MrpG são subunidades menores e MrpH extremidade terminal responsável pela adesividade da fímbria. *mrpI* codifica a proteína regulatória MrpI, envolvida na regulação transcripcional (ON/OFF) do operon (Bahrani e Mobley, 1994; Li *et al.*, 1999).

Bahrani e Mobley (1994), verificaram, através de comparação com a seqüência de aminoácidos das proteínas que compõem as fímbrias de outros microrganismos, fímbrias tipo 1 e P de *E. coli* e, a hemaglutinina manose resistente de *Serratia marcescens*, que a fímbria MR/P possui similaridades significativas com essas fímbrias, podendo também ser classificada no modelo *chaperone-usher*.

Li *et al.* (1999), propuseram que a proteína MrpH estaria localizada na extremidade da fímbria e seria a adesina funcional. Ainda, verificaram que ela é essencial para a montagem da fímbria, porém, mutações no gene *mrpH* não levaram à perda da hemaglutinação. Esses autores sugeriram que nesse caso a expressão de uma outra fímbria hemaglutinina possa ter sido induzida. Por outro lado, mutações nos genes *mrpA*, *mrpB* e *mrpG* abolem a hemaglutinação (Li *et al.*, 1997).

As condições ideais de expressão da fímbria MR/P são 37°C em caldo Luria Bertani (LB), estático por 48 horas. A inibição de expressão dessa fímbria ocorre em ágar LB 37°C por 18 horas ou 37°C em meio mínimo de sais, aerado por 48 horas (Bahrani e Mobley, 1994; Zhao *et al.*, 1997).

Bahrani *et al.* (1991), estudando a ITU provocada por *P. mirabilis* em camundongos CBA infectados transuretralmente, relatam que a fímbria MR/P tem um possível papel na ITU devido à forte resposta imunológica ao antígeno nos animais experimentalmente infectados.

Bahrani *et al.* (1994), ao caracterizarem um mutante para o gene *mrpA* em ratos infectados transuretralmente, demonstraram redução na colonização da urina, bexiga e rins em 6, 28 e 18 vezes, respectivamente. Esses resultados demonstram que a fímbria MR/P é importante na colonização e uropatogenicidade de *P. mirabilis*.

Zunino *et al.* (2001), estudando mutante *mrpA* num ensaio *in vitro* de cultura de células uroepiteliais de bexiga, observaram que nos primeiros 15 minutos não houve diminuição significativa da adesão do mutante em relação ao selvagem, mas após 1 hora a diminuição foi significativa, não sendo totalmente abolida.

1.3.5 Fímbria Manose-Sensível (MS)

A fímbria manose-sensível (MS) tipo 1 é encontrada em vários gêneros dentro da família *Enterobacteriaceae*. É uma fímbria composta principalmente por um único monômero de proteína.

A fímbria MS é codificada por um grupo de genes que incluem genes responsáveis pela subunidade estrutural, pela adesina, por várias proteínas acessórias envolvidas no transporte, montagem e fixação da fímbria e proteínas reguladoras (Johnson,1991). O gene *fimA* codifica a subunidade estrutural da fímbria, *fimC* e *fimD* codificam proteínas periplasmáticas pertencentes à família das chaperoninas que estão envolvidas na montagem e fixação da fímbria (Abraham *et al.*,1987), *fimE* e *fimB* determinam a variação de fase da expressão fímbrial, controlando a orientação dos 300 pares de bases que compreendem o promotor

para o gene *fimA* (Abraham *et al.*,1987; Dorman e Higgins,1987). O gene *fimF* está relacionado com a biogênese da fímbria e os genes *fimH* e *fimG* codificam duas subunidades proteicas de 29 KDa e 14 KDa, respectivamente, responsáveis pela adesão íntima a receptores D-manose nas células (Abraham *et al.*,1987).

Bactérias que expressam a fímbria MS tipo 1 aglutinam eritrócitos de diferentes espécies animais, entretanto o eritrócito de cobaia é comumente usado nos testes de hemaglutinação. A aderência mediada pela fímbria tipo 1 é inibida por D-manose ou alfa-metilmanosídeo e por concanavalina A, mas não pela adição de outros monossacarídeos ou seus derivados. A temperatura não interfere na capacidade hemaglutinante da fímbria tipo 1 como acontece com as fímbrias manose-resistente (Johnson, 1991).

A ocorrência da fímbria MS em *Proteus* spp é pouco documentada. Alguns autores reportaram sua ocorrência, mas raramente associadas a ITU (Old e Adegbola, 1982; Mobley e Chippendale, 1990).

1.4 ADESÃO AGREGATIVA

A adesão agregativa foi descrita por Nataro *et al.*, (1987), onde estudando amostras de *E. coli* em um estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia em crianças, verificaram que algumas amostras formavam agregados bacterianos que aderiam, em cultura de células HEp-2 e na lamínula, numa forma de tijolos empilhados, sugerindo então uma nova categoria de *E. coli* diarreioagregativa, a *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC).

Favre-Bone *et al.* (1995), demonstraram que *Klebsiella pneumoniae* adere agregativamente *in vitro* em cultura de células Int-407 e esse tipo de adesão requer a participação tanto da célula mamífera quanto de componentes da cápsula bacteriana.

A autoagregação pode ajudar a bactéria em persistentes ações contra o sistema imunológico. Permite um aumento da densidade bacteriana, o que torna possível a passagem de moléculas sinalizadoras através desta população, tornando assim persistente a infecção. Autoagregação permite, quantitativamente, maior adesão (Jansen *et al.*, 2004).

1.5 BIOFILME

Biofilmes bacterianos são definidos como comunidades complexas de microrganismos aderidos a um substrato onde interagem entre si e tipicamente estão envoltos por uma matriz extracelular (Costerton *et al.*, 1995).

Os microrganismos ao invés de aderir individualmente possuem essa capacidade de adesão formando aglomerados bacterianos. Portanto o biofilme é formado por camadas múltiplas de bactérias, em associação ou não com outros microrganismos aderidos a diferentes tipos de superfície, como plástico, vidro, metal, entre outros materiais (Donlan, 2002).

Atualmente, o termo biofilme é utilizado de forma mais abrangente para designar qualquer comunidade bacteriana aderida a um substrato, independentemente da natureza da superfície (Donlan e Costerton, 2002).

A importância médica da formação dos biofilmes bacterianos reside no fato destes serem usualmente relacionados a infecções persistentes, como no caso de infecções com cateteres e de implantes cirúrgicos, sendo uma causa comum de infecções hospitalares, e também pelo fato desses microrganismos apresentarem maior resistência aos antimicrobianos (Donlan e Costerton, 2002).

A formação de biofilme por *P. mirabilis*, em materiais que constituem cateter urinário, é um fenômeno muito bem documentado (Mobley e Warren, 1987; Sabbuba *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004). Sabbuba *et al.* (2002), verificaram que *P. mirabilis* migra, coloniza e forma biofilme em 4 tipos diferentes de cateteres urinário: latex-hidrogel, latex-hidrogel com prata, latex-silicone e silicone.

Jansen *et al.* (2004), estudando duas cepas mutantes: MR/P ON que sempre expressa a fímbria e, MR/P OFF, que nunca expressa a fímbria e também estudando a amostra selvagem HI 4320; verificaram que MR/P ON forma, em lamínula de vidro, um biofilme característico, ou seja, com estrutura tridimensional e com canais, enquanto MR/P OFF e selvagem formavam os estágios iniciais de adesão mas, não formavam a estrutura característica do biofilme.

2 OBJETIVO

Foi realizado em nosso laboratório um estudo em 35 amostras de *P. mirabilis* uropatogênico isoladas de pacientes atendidos em clínicas e hospitais da cidade de Londrina – PR. Nessas amostras foram estudados o modelo de adesão em cultura de células HEp-2 e formação de biofilme em poliestireno. Todas as amostras apresentaram adesão agregativa em células HEp-2 e na lamínula. Também foram capazes de aderirem ao poliestireno.

A partir desses resultados, nosso objetivo foi estudar a participação da fímbria MR/P no modelo de adesão agregativa e na formação de biofilme (adesão em poliestireno), através de nocaute gênico no gene *mrpA* da amostra *P. mirabilis* UEL-13.

3 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.**, 169, p. 5530-5536, 1987.
- BAHRANI, F.K.; COOK, S.; HULL, R.A.; MASSAD, G.; MOBLEY, H.L.T. *Proteus mirabilis* fimbrial N-terminal amino acid sequence of a major fimbrial subunit and nucleotide sequences of the gene from two strains. **Infect. Immun.**, 61, p. 884-891, 1993.
- BAHRANI, F.K.; JOHNSON, D.E.; ROBBINS, D.; MOBLEY, H.L.T. *Proteus mirabilis* flagella and MR/P fimbriae: isolation, purification, n-terminal analysis, and serum antibody response following experimental urinary tract infection. **Infect. Immun.**, 59, p. 3574-3580, 1991.
- BAHRANI, F.K.; MOBLEY, H.L.T. *Proteus mirabilis* MR/P fimbrial operon: genetic organization, nucleotide sequence, and conditions for expression. **J. Bacteriol.**, 62, p. 3363-3371, 1994.
- BAHRANI, F.K.; MASSAD, G.; LOCKATELL, C.V.; JOHNSON, D.E.; RUSSELL, R.G.; WARREN, J.W.; MOBLEY, H.L.T. Construction of an MR/P fimbrial mutant of *Proteus mirabilis*: role in virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. **Infect. Immun.**, 176, p. 3412-3419, 1994.
- BIJLSMA, I.G.W.; VAN DIJK, L.; KUSTERS, J.G.; GAASTRA, W. Nucleotide sequences of two fimbrial major subunit genes, *pmpA* and *ucaA* from canine-uropathogenic *Proteus mirabilis* strains. **Microbiology**, 141, p. 1349-1357, 1995.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, 49, p. 711-745, 1995.
- COKER, C.; POORE, C.A.; LI, X.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microb. Infect.**, 2, p. 1497-1505, 2000.
- DAIFUKU, R.; STAMM, W. E. Bacterial adherence to bladder uroepithelial cells in catheter-associated urinary tract infection. **N. Engl. J. Med.**, 314, p. 1208-1213, 1986.
- DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, 8, p. 881-890, 2002.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, 15, p. 167-193, 2002.

DORMAN, C.J.; HIGGINS, C. Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. **J. Bacteriol.**, 169, p. 3840-3843, 1987.

EDWARDS, R.A.; PUENTE, J.L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends Microbiol.**, 6, p. 282-287, 1998.

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

JANSEN, A.M.; LOCKATELL, V.; JOHNSON, D.E.; MOBLEY, H.L.T. Mannose-Resistant *Proteus*-Like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. **Infect. Immun.**, 72, p. 7294-7305, 2004.

JONES, B.V.; YOUNG, R.; MAHENTHIRALINGAM, E.; STICKLER, D.J. Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. **Infect. Immun.**, 72, p. 3941-3950, 2004.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.** 4, p. 80-128, 1991.

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.; ZHAO, H.; GEYMONAT, L.; BAHRANI, F.; JOHNSON, D.E.; MOBLEY, H.L.T. *Proteus mirabilis* mannose-resistant, *Proteus*-like fimbriae: MrpG is located at the fimbrial tip and is required for fimbrial assembly. **Infect. Immun.** 65, p. 1327-1334, 1997.

LI, X.; JOHNSON, D.E.; MOBLEY, H.L.T. Requirement of MrpH for mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae mediated hemagglutination by *Proteus mirabilis*. **Infect. Immun.**, 67, p. 2822-2833, 1999.

LI, X.; MOBLEY, H.L.T. Vaccines for *Proteus mirabilis* in urinary tract infection. **Int. J. Antimicrobial Agents.**, 19, p. 461-465, 2002.

LI, X.; LOCKATELL, C.V.; JOHNSON, D.E.; LANE, M.C.; WARREN, J.W.; MOBLEY, H.L.T. Development of an intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis*. **Infect. Immun.**, 72, p. 66-45, 2004.

MANDELE, DOUGLAS, BENNEH'S. **Principles and Practise of infections diseases**. Fifth Edition. New York, N.Y, p. 773-801, 2000.

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

MASSAD, G.; LOCKATTELL, C.V., JOHSON, D.E., MOBLEY, H.L.T. *Proteus mirabilis* fimbriae: construction of an isogenic *pmfA* mutant and analysis of virulence in a CBA mouse model of ascending urinary infection. **Infect. Immun.**, 62, p. 536-542, 1994b.

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

MOBLEY, H.T.L.; CHIPPENDALE, G.R. Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. **J. Infect. Dis.**, 161, p. 525-530, 1990.

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

MOBLEY, H.L.T. Virulence of *Proteus mirabilis*. In: H.L.T. Mobley and J.W. Warren. **Urinary Tract Infection: Molecular pathogenesis and clinical management**. ASM Press. Washington, D.C. p. 245-269, 1996.

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

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, 6, p. 829-831, 1987.

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

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

- PELLEGRINO, R.; GALVALISI, U.; SCAVONE, P.; SOSA, V.; ZUNINO, P. Evaluation of *Proteus mirabilis* structural fimbrial proteins as antigens against urinary tract infections. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 36, p. 103-110, 2003.
- SABBUBA, N.; HUGHES, G.; STICKLER, D.J. The migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over Foley catheters. **BJU Intern.**, 89, p. 55-60, 2002.
- 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.
- TOLSON, D.L.; HARRISON, B.A.; LATTA, R.K.; LEE, K.K.; ALTMAN, E. The expression of nonagglutinating fimbriae and its role in *Proteus mirabilis* adherence to epithelial cells. **Can.J. Microbiol.**, 43, p. 709-717, 1997.
- WELCH, R.A. Identification of two different hemolysins determinants in uropathogenic *Proteus* isolates. **Infect. Immun.**, 55, p. 2183-2190, 1987.
- WRAY, S.K.; HULL, S.I.; COOK, R.G.; BARRISH, J.; HULL, R.A. Identification and characterization of urothelial cell adhesin from an uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. **Infect. Immun.**, 54, p. 43-49, 1986.
- ZHAO, H.; LI, X.; JOHNSON, D.E.; BOLNFIELD, I.; MOBLEY, H.L.T. In vivo phase variation of MR/P fimbrial gene expression in *Proteus mirabilis* infecting the urinary tract. **Mol. Microbiol.**, 48, p. 1009-1019, 1997.
- ZUNINO, P.; GEYMONAT, L.; ALLEN, A.G.; LEGNANI-FAJARDO, C.; MASKELL, D.J. Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. **FEMS Immunol. Med. Mic.**, 29, p. 137-143. 2000.
- ZUNINO, P.; GEYMONAT, L.; ALLEN, A.G.; PRESTON, A.; SOSA, V.; MASKELL, D.J. New aspects of the role of MR/P fimbriae in *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **FEMS Immunol. Med. Mic.**, 31, p. 113-120. 2001.
- ZUNINO, P.; SOSA, V.; ALLEN, A.G.; PRESTON, A.; GERALDINE, S.; MASKELL, D.J. *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. **Microbiol.**, 149, p. 3231-3237, 2003.

**4 TRABALHO CIENTÍFICO: THE MR/P FIMBRIAE OF UROPATHOGENIC
PROTEUS MIRABILIS IS INVOLVED IN THE AGGREGATIVE ADHERENCE TO
HEP-2 CELLS**

Sérgio P. D. Rocha ^{1,2}; Waldir P. Elias ²; Michele R. L. Silva ¹; Júlia M.
Nara ²; Aurora M. Cianciarullo ³; Cristiano G. Moreira ² and Jacinta S.
Pelayo ^{1*}

*Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina ¹, 86051-970 Londrina,
PR, Brazil; Laboratório de Bacteriologia ² and Laboratório de Genética ³, Instituto Butantan,
05503-900 São Paulo, SP, Brazil*

Keywords: *Proteus mirabilis*, MR/P fimbriae, Aggregative adherence, Biofilm.

*Corresponding author: E-mail: jspelayo@sercomtel.com.br; Fax: + 55 (043) 3371-4207

ABSTRACT

Proteus mirabilis is an important cause of urinary tract infection (UTI). In this study 35 strains of *P. mirabilis* isolated from UTI in Londrina, Brazil, were examined for the adherence capacity to epithelial cells and biofilm formation on polystyrene. All isolates displayed the aggregative adherence to HEp-2 cells in the 6 h-assay and were able to produce biofilm. The mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae (MR/P), *Escherichia coli* type I fimbriae (TIF) and AAF/I, II and III fimbria of enteroaggregative *E. coli* (EAEC) were searched by the presence of their respective adhesin genes, as well as the EAEC probe fragment sequence. The *mrpA* and *mrpH* genes of MR/P fimbriae were detected in all isolates, as well as MR/P expression, detected by hemagglutination of chicken erythrocytes. On the other hand, none of the remaining gene sequences was detected, indicating the presence of a distinct aggregative adhesin that mediates the AA and biofilm formation in *P. mirabilis*. Lack of TIF expression was confirmed by the absence of guinea pig erythrocytes agglutination. In order to characterize if MR/P was involved in the establishment of AA in these strains, a non-polar mutation of *mrpA* was obtained in *P. mirabilis* UEL-13, and its phenotypical analysis demonstrated that MR/P is involved in the aggregative adherence to HEp-2 cells, as well as in biofilm formation. However, these phenotypes are multifactorial, since the *mrpA* mutation did not abolish both phenotypes completely. Our results suggested that the AA pattern of *P. mirabilis* was associated with MR/P fimbriae expression, since this characteristic is associated with biofilm formation, which may be an important step for the establishment of UTI in catheterized patients.

1. INTRODUCTION

Proteus mirabilis is a common cause of urinary tract infection (UTI) in patients with short and long-term indwelling urinary catheters, and in individuals with structural or functional abnormalities of the urinary tract. These infections may cause cystitis and serious complications such as pyelonephritis, bacteremia and stone formation, which can produce severe damage in kidney tissue and may block catheters (Coker *et al.*, 2000; Rózalski *et al.*, 1997).

P. mirabilis expresses several putative virulence factors, such as urease, flagella (associated with the swarming phenomenon), fimbriae, resistance to normal serum, outer-membrane proteins, IgG and IgA proteases and invasiveness in tissues (Rózalski *et al.*, 1997). A variety of fimbriae and hemagglutinins were detected in *P. mirabilis*, such as the mannose resistant *Proteus*-like fimbriae (MR/P), the mannose resistant *Klebsiella*-like hemagglutinin (MR/K), the nonagglutinating fimbriae (NAF), the *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF), the ambient-temperature fimbriae (ATF), the *Proteus mirabilis* P-like fimbriae (PMP), and the mannose-sensitive fimbriae (MS). However, the mechanisms by which *P. mirabilis* adhere to epithelial cells in vivo is not completely understood (Rózalski *et al.*, 1997; Bahrani and Mobley, 1994; Gerlach *et al.*, 1988).

Among the adherence structures described in *P. mirabilis*, MR/P is the most important and the best understood, and it has been associated with pyelonephritis (Bahrani and Mobley, 1994; Old and Adegbola, 1982). This fimbriae is encoded by the *mrp* gene cluster that contains two divergent transcripts, *mrpABCDEFGHJ* (*mrp* operon) and *mrpI*. *mrpA* encodes the major structural fimbrial subunit, *mrpBEFG* encodes the smaller subunits, *mrpD* encodes the chaperone, *mrpC* encodes the usher, *mrpH* encodes the pilin of fimbriae and *mrpJ* encodes a protein that represses transcription of the flagellar regulon (Bahrani and Mobley, 1994; Li *et*

al., 1999; Li *et al.*, 2001). *mrpI* encodes a recombinase that switches the invertible element from ON to OFF (transcription of the *mrp* operon) or from OFF to ON , which prevents the transcription of the *mrp* operon (Zhao *et al.*, 1997).

Jansen *et al.* (2004) investigated the role of MR/P fimbriae in biofilm production and demonstrated that MR/P fimbriae promote initial biofilm formation, with the fimbriae leading to aggregation of the bacteria. Studies suggesting fimbriae-mediated adhesion to tissue culture cells in vitro were reported by some authors, but none of them has described a characteristic pattern of adherence for *P. mirabilis* (Cook *et al.*, 1995; Sareneva *et al.*, 1990).

Since the aggregative adherence (AA) described in enteroaggregative *E. coli* (Nataro *et al.*, 1987) is closely associated with biofilm formation in that pathotype (Sheikh *et al.*, 2001), we decided to investigate the adherence pattern to HEp-2 culture cells of *P. mirabilis* strains isolated from patients with urinary tract infection and to characterize the AA pattern displayed by those isolates.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Bacterial strains and vectors

Thirty-five *Proteus mirabilis* isolated from urine of patients (1-71 years old; median age, 25) with community-acquired urinary tract infection were examined in this study. The population analyzed (21 men and 14 women) was selected from patients attending the emergency room of public hospitals and a clinical laboratory in the city of Londrina, Brazil. Strains were isolated between April 2001 and May 2002. The bacterial isolates were identified by MicroScan (Behring-DADE, California, CT) using the Neg Combo 20 plates. The identification was confirmed by biochemical tests in our laboratory (Toledo *et al.*, 1982a; Toledo *et al.*, 1982b) and isolates were stored at -70°C in tryptic soy broth (TSB) (Biobras, Brazil), with 20% glycerol. The suicide vector pJP5603 and *E. coli* S17-1(λ pir) (Penfold and Pemberton, 1992), were employed in the mutagenesis experiments. The following strains were used as positive control for PCR studies: *P. mirabilis* HI4320 for *mrpA* and *mrpH* (Mobley and Warren, 1987), *E. coli* V-27 for *fimH* (Johnson and Stell, 2000), *E. coli* 042 (Czeczulin *et al.*, 1997) for EAEC probe, *aafA*, *agg3C* and *E. coli* 17-2 (Nataro *et al.*, 1992) for *aggA*. *E. coli* K12 HB101 (Sambrook *et al.*, 1989) was employed as negative control in PCR reactions. The antibiotics kanamicin (50 μgml^{-1}), polymyxin B (50 μgml^{-1}) and ampicillin (100 μgml^{-1}) were employed as indicated.

2.2. Polymerase chain reaction (PCR)

The *P. mirabilis* isolates were screened for the presence of the following genetic sequences: *mrpA* (major subunit of MR/P) and *mrpH* (pilin of MR/P) (Gen Bank accession number Z32686), *fimH* (adhesin subunit of type I fimbriae) (Johnson and Stell, 2000), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) probe (plasmid fragment of the EAEC virulence plasmid)

(Schmidt *et al.*, 1995), *aggA* (pilin of AAF/I fimbriae of EAEC) (Nataro *et al.*, 1992), *aafA* (pilin of AAF/II fimbriae of EAEC) (Czeczulin *et al.*, 1997), and *agg3C* (usher subunit AAF/III fimbriae of EAEC) (Bernier *et al.*, 2002). Table 1 shows the primers sequences, sizes of amplified DNA fragments, and annealing temperature for the sequences studied. The *mrpA* and *mrpH* primers were designed to amplify a 648-bp and a 444-bp DNA fragments, respectively. These fragments correspond to the 5'-region from nucleotide 1778 to 2426, and from nucleotide 8301 to 8745, of the published sequence of *mrpA* and *mrpH*, respectively (Gen Bank accession number Z32686). *P. mirabilis* HI4320 (Mobley and Warren, 1987) was used as positive control for *mrpA* and *mrpH*, *E. coli* V-27 for *fimH* (Johnson and Stell, 2000), *E. coli* 042 (Czeczulin *et al.*, 1997) for EAEC probe, *aafA* and *agg3C* and *E. coli* 17-2 (Nataro *et al.*, 1992) for *aggA*.

2.3. Hemagglutination assay

Type one fimbriae expression was assayed by the mannose-sensitive (MS) hemagglutination of guinea pig erythrocytes in the absence but not in the presence of 50 mM mannose (Mobley and Chippendale, 1990). MR/P hemagglutination was investigated by microplate agglutination of tannic acid-treated and non-treated chicken erythrocytes, as previously described by Bahrani *et al.* (1994).

2.4. Adherence to HEp-2 assays

P. mirabilis isolates were tested for adherence to HEp-2 cells using 3 and 6 h of bacteria-epithelial cells incubation period, as described by Cravioto *et al.*, 1979.

In order to quantify the number of bacteria adhering to the epithelial cells and to the coverslips, the following protocol was employed (Moreira *et al.*, 2003). After the 6 h incubation period, non-adherent bacteria were removed from the monolayers by washing with

400 μl of 1% (v/v) Triton X-100 solution (Sigma Aldrich, USA) in each well of the tissue culture plate. After 10 min of incubation at room temperature, 1.6 ml of PBS was added to the wells and homogenized by pipetting several times. Serial dilutions (1:10) in PBS were plated on MacConkey agar, incubated overnight and the colonies were counted to calculate the CFU ml^{-1} . All assays were performed in triplicate.

2.5. Biofilm formation

The assay for biofilm formation on a polystyrene solid surface was adapted from the method of Jansen *et al.*, 2004. The bacterial culture was grown in 3 ml of LB broth during 48 h at 37°C statically. Then, 20 μl of this culture were added to 180 μl LB broth in a polystyrene 96 wells plate (Corning Incorporated, USA). LB broth containing wells were used as negative control. The plate was incubated for 24h at 37°C. The LB broth, as well as any non-adherent bacteria, was decanted from the wells, and any remaining planktonic cells were removed by three rinses with sterile distilled water. The wells were air dried, and adherent bacteria were stained for 15 min with 0,1% crystal violet. After three rinses with sterile distilled water, bacterium-bound dye was released by the addition of 200 μl of dimethyl sulfoxide (Sigma Aldrich, USA). One hundred microliters of the dimethyl sulfoxide-crystal violet solution was transferred to other well and the OD₅₉₅ was determined on an ELISA reader. The cut-off OD (OD_c) was defined as three standard deviations above the mean OD of the negative control. Strains were classified as follows: non-adherent (OD \leq OD_c), weakly adherent (OD_c < OD \leq 2 x OD_c), moderately adherent (2 x OD_c < OD \leq 4 x OD_c) and strongly adherent (4 x OD_c < OD). All assays were performed in triplicate.

2.6. MR/P mutagenesis

MR/P mutagenesis was achieved by constructing a non-polar knockout of the *mrpA* gene, which encodes the major subunit of MR/P fimbriae, using the suicide vector pJP5603 (Penfold and Pemberton, 1992). This strategy was used to investigate the role of MR/P fimbriae in the accentuated AA pattern of strain *P. mirabilis* UEL-13. A *mrpA* internal primer (Table 1) was designed to amplify a 419-bp DNA fragment, corresponding to the 5'-region from nucleotide 1913 to 2332 of the published sequence of *mrpA* (Gen Bank accession number Z32686). The PCR product were ligated with the vector pGEN-T Easy (Promega Corporation, USA), following the manufactures instructions. After ligation and transformation into host *E. coli* JM 109, the transformants were selected on LB agar plates containing ampicillin. Transformants were analyzed for correct insert cloning and the selected construct (pSR1), carrying an internal *mrpA* nucleotide sequence, was digested with *EcoRI*. The internal *mrpA* fragment with sites of *EcoRI* was cloned into the corresponding site of the suicide vector pJP5603. After ligation and transformation by eletroporation into host S17-1(λ pir), the transformants were selected on LB agar plates containing kanamycin. Resulting transformants were analyzed for correct cloning, and the pSR2 plasmid was selected. The S17-1(λ pir) containing pSR2 was then conjugated with wild-type strain *P. mirabilis* UEL-13 by filter mating on cellulose nitrate membranes. Transconjugants were selected in LB agar plates containing kanamycin and polymixin and their identity were confirmed by biochemical tests (Toledo *et al.*, 1982a; Toledo *et al.*, 1982b). The non-polar *mrpA* mutant selected was designed *P. mirabilis* UEL-13::*mrpA*.

The correct insertion site of pSR2 integration into *P. mirabilis* UEL-13 was determined by Southern blot analysis (Sambrook *et al.*, 1989). Since *AvaI*-restriction fragment of *P. mirabilis* harbors *mrpA*, this restriction fragments of *P. mirabilis* UEL-13 and UEL-13::*mrpA* chromosomal DNA were hybridized using the 419-bp *mrpA* amplicon as gene

probe (Table 1). This assay was performed employing the ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System kit (Amersham Biosciences, USA), following the manufacturers instructions.

2.7. SDS-PAGE and immunoblotting detection of MR/P

The extraction and purification of MR/P fimbriae was performed following the methodology described by Gíron *et al.* (1991). The fimbrial preparations were denatured by boiling for 5 min, solubilized in sodium dodecyl sulfate (SDS)-gel sample buffer, subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (12% polyacrylamide). The gels were either silver stained or transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblots were developed employing a polyclonal antiserum raised against *P. mirabilis* UEL-17 MR/P producing-strain in New Zealand rabbits (Ewing, 1986). The antiserum was absorbed during ten days against the same strain grown onto 1.5% LB agar overnight, condition that inhibits MR/P expression (Zhao *et al.*, 1997).

2.8. Transmission electron microscopy

Expression of MR/P was examined by immunogold assay (Nara *et al.*, 2005), employing anti-MR/P and IgG protein-gold of 10 nm. Grids were examined with a ZEISS EM 109 transmission electron microscopy (ZEISS, Germany).

3. RESULTS

The ability of uropathogenic *P. mirabilis* to adhere to epithelial cells in vitro was evaluated in HEp-2 cells. All 35 strains presented few bacteria forming aggregates on both coverslip and HEp-2 cells surfaces after 3 h of incubation (Fig. 1A). Interestingly, after 6 h of incubation all strains showed the characteristic AA pattern, with predominance of bacteria adherence to coverslip (Fig. 1B). The capacity to form biofilm on polystyrene was also investigated due to its association with the expression of AA pattern in EAEC. All 35 isolates were able to adhere to the inert substratum, 15 (42.8%) of the isolates presented strong adherence, 10 (28.6%) moderate adherence and 10 (28.6%) weak adherence to polystyrene.

Since the AA pattern to HEp-2 cells was observed among these strains, we searched the presence of EAEC adherence related fimbrial (AAF/I, II and III) genes, as well as the EAEC probe fragment. None of these EAEC associated genes were detected among all *P. mirabilis* strains. The adhesin subunit of TIF was also searched in all isolates and the results correlated with the hemagglutination of guinea pig erythrocytes. The *fimH* gene and expression of mannose-sensitive hemagglutination of guinea pig erythrocytes were not detected in any of the 35 isolates, indicating the lack of TIF among these isolates.

On the other hand, the presence of MR/P related genes *mrpA* and *mrpH*, was detected among all isolates of this study. These results were correlated with the expression of MR/P, also detected in all isolates by hemagglutination of chicken erythrocytes in the presence and absence of tannic-acid.

Due to the fact that all strains of this study presented the AA pattern to HEp-2 cells and the MR/P associated genes, we decided to further investigate the role of MR/P in the AA pattern of *P. mirabilis*. For these experiments the *P. mirabilis* UEL-13 was chosen as the prototype strain. This prototype strain was capable of agglutinating tannic acid-treated and

non-treated chicken erythrocytes and displayed a strong AA pattern after 6 h of incubation as shown in Fig. 1B.

A *mrpA* non-polar mutation of the prototype strain was obtained using a construction in a suicide vector (pRS2), which was designated *P. mirabilis* UEL-13::*mrpA*. In order to determine whether there were differences other than expression of MR/P fimbriae, we compared the mutant strain with the wild-type parental strain for a number of biochemical characteristics (Toledo *et al.*, 1982a; Toledo *et al.*, 1982b), and no differences were found for any of biochemical markers. The pRS2 insertion in strain UEL-13 was verified by acquired kanamycin resistance and the correct localization of insertion was checked by Southern blot analysis of *AvaI* UEL-13::*mrpA* genomic DNA digestion (data not shown). The lack of expression of MR/P fimbriae in the non-polar mutant was examined by hemagglutination of chicken erythrocytes, immunoblotting and immunogold assays.

As presented in Fig. 2A, in the SDS-PAGE analysis of fimbrial extracts it could be possible to detect a band of relative molecular weight apparent 17 kDa, corresponding to the MrpA subunit, only in wild-type strains UEL-13 and HI4320 (data not shown). The antisera against MR/P recognized these same bands of 17 kDa in the wild type strains, which was absent in the mutant UEL-13::*mrpA* (Fig. 2B). The *P. mirabilis* UEL-13::*mrpA* strain was also incapable of agglutinating chicken erythrocytes (in the presence and the absence of tannic acid), confirming the lack of MR/P expression.

The lack of expression of MR/P fimbriae also was verified by immunogold assays. As presented in Fig. 3A, the antisera against MR/P recognized just fimbriae in the wild-type strains UEL-13 but, in Fig. 3B don't recognized nothing in the mutant UEL-13::*mrpA*.

The adherence pattern of UEL-13::*mrpA* was investigated employing HEp-2 cells. A very few adherent bacteria was observed in the 3 h assay (Fig. 1C). In the 6-h assay, a non-

characteristic pattern of adhesion was detected (Fig. 1D), showing a strong reduction of the AA pattern in comparison to strain UEL-13 (Fig. 1B).

The reduction of the aggregative adherent bacteria displayed by the *mrpA* mutant was quantified by CFU counts of HEp-2 cell-adherent bacteria. As shown in Fig. 4, wild-type *P. mirabilis* strain formed a significantly adhesion than mutant strain ($P = 0.0020$ and 0.0464 , respectively). Biofilm formation was also reduced in the *mrpA* mutant (Fig. 5). Wild-type strain formed a significantly biofilm than mutant strain ($P = 0.0194$ and 0.0018 , respectively).

4. DISCUSSION

Several potential virulence factors have been described in uropathogenic *P. mirabilis*, including adhesins and secreted proteins (Rózaslki *et al.*, 1997). In this work, we have analyzed the adherence properties of *P. mirabilis* isolates from community-acquired UTI. All isolates presented the characteristic AA pattern to HEp-2 cells, which defines the EAEC patotype (Nataro *et al.*, 1987). The AA pattern to HEp-2 is characterized by the stacked-brick formation of bacteria adhered to both epithelial cells and coverslip (Nataro *et al.*, 1987). Studies suggesting fimbriae-mediated *P. mirabilis* adhesion to tissue culture cells in vitro were reported by some authors (Cook *et al.*, 1995; Sareneva *et al.*, 1990), but none of them has described a characteristic pattern of adherence. Besides in EAEC, the AA has been demonstrated only by *Klebsiella pneumoniae* strains, although to human intestine-407 cells (Favre-Bonte *et al.*, 1995).

All *P. mirabilis* isolates demonstrated the capacity to form biofilm on polystyrene, as previously demonstrated by other authors (Sabbuba *et al.*, 2002; Jansen *et al.*, 2004). The ability of these strains to adhere to plastic may be important for the establishment of urinary tract infections in catheterized patients. In fact, of all nosocomial infections, 40% occur in the UTI and more than 60% of these are related to an indwelling urethral catheter (Roberts *et al.*, 1990). As described for EAEC (Sheikh *et al.*, 2001), the biofilm formation is be associated to the AA pattern presented by these isolates. Interestingly, none of the isolates presented the EAEC fimbriae associated genes, indicating the presence of an EAEC non-related adhesin among them.

Recently a role of TIF in the aggregative adherence of EAEC was described (Moreira *et al.*, 2003), which led us to investigate its presence among the isolates of this study. The *fimH* gene and expression of mannose-sensitive hemagglutination of guinea

pig erythrocytes were not detected in any of the 35 isolates. Adegbola *et al.* (1983) also observed that the mannose-binding type 1 fimbriae are rarely expressed by uropathogenic strains of *P. mirabilis* (Adegbola *et al.*, 1983).

Since all isolates presented the MR/P fimbriae we investigated the involvement of MR/P fimbriae in the establishment of the characteristic AA pattern presented by the uropathogenic *P. mirabilis* isolates. A knockout of *mrpA* generated a MR/P non-expressing mutant and its phenotypical analysis confirmed its involvement in the AA pattern of *P. mirabilis*, since AA was notably reduced in comparison to their respective wild-type strain, but not abolished. In fact, MR/P seems to act as a cofactor in the establishment of the AA pattern, since the lack of MR/P expression partially reduced that phenotype. It may be possible that any of the other adhesins already described in *P. mirabilis* (Massad and Mobley., 1994; Cook *et al.*, 1995; Zunino *et al.*, 2000) participate in this multifactorial phenotype, indicating the presence of others factors mediating this phenotype in *P. mirabilis*. These data suggest that colonization is multifactorial and that a number of fimbriae may work efficiently all together to colonize the bladder and kidneys. Further studies evaluating the role of these other adhesins are necessary to understand the AA pattern presented by *P. mirabilis*. Bahrani *et al.*(1994), constructed an *mrpA* mutant by allelic exchange and verified that this mutant failed to express MR/P fimbriae and lost the ability to hemagglutinate erythrocytes. These phenotypes were restored when the *mrpA* gene was supplied in trans.

The role of MR/P in the capacity to form biofilm on polystyrene was also evaluated in the MR/P mutant. Biofilm formation was significantly reduced but not abolished, similarly to the observation in the adherence assay to epithelial cells. Jansen *et al.* (2004), studying MR/P mutants verified that MR/P ON formed a significantly larger biofilm than either MR/P OFF or the wild-type strain, but MR/P OFF was not significantly than the

wild-type. However, in this study we have not evaluated the effect of the ON-OFF mechanism of regulation on the AA phenotype.

Fimbriae-mediated adherence to uroepithelial cells and kidney epithelium may be essential for virulence of *P. mirabilis* and plays an important role in the pathogenesis of UTI (Rózalski *et al.*, 1997). These bacteria may express several types of fimbriae simultaneously, and their expression has been correlated with hemagglutination profiles (Moblely and Chippendale, 1990).

The *P. mirabilis* studied presented several potential virulence factors, which may contribute to the pathogenesis of UTI, specially the AA pattern to epithelial cells and the capacity to adhere to inert surfaces. Identifying these factors-encoding genes and evaluating specific mutations for each factor in an animal model could assess the role of these phenotypes in the pathogenesis of *P. mirabilis*.

5. REFERENCES

- Adegbola, R.A., Old, D.C. and Senior, B.W. (1983).** The adhesins and fimbriae of *Proteus mirabilis* strains associated with high and low affinity the urinary tract. . *Med. Microbiol.* **16**, 427-431
- Bahrani, F.K., Massad, G., Lockatell, C.V., Johnson, D.E., Russell, R.G., Warren, J.W. and Mobley, H.L.T. (1994).** Construction of an MR/P fimbrial mutant of *Proteus mirabilis*: role in virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun.***176**, 3412-3419.
- Bahrani, F.K. and Mobley, H.L.T. (1994)** *Proteus mirabilis* MR/P fimbrial operon: genetic organization, nucleotide sequence, and conditions for expression. *J. Bacteriol.* **176**, 3412-3419.
- Bernier, C., Gounon, P. and Le Bouguéneq, C. (2002).** Identification of an aggregative adhesion fimbriae (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect Immun* **70**, 4302-4311.
- Coker, C., Poore, C.A., Li, X. and Mobley, H.L.T. (2000).** Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microb Infect* **2**, 1497-1505.
- Cook, S.W., Mody, N., Valle, J. and Hull, R. (1995).** Molecular cloning of *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adherence (*uca*) genes. *Infect Immun* **63**, 2082-2086.
- Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M. and Rowe, B. (1979).** An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* **3**, 95-99.
- Czczulin, J.R., Balepur S., Hicks S., Phillips A., Hall, R., Kothary, M.H., Navarro-Garcia, F, and Nataro, J.P. (1997).** Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial

antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**, 4135-4145.

Ewing, W. H. Edwards and Ewing's Identification of *Enterobacteriaceae*. 3^o ed. New York: Elsevier Ed., 1986.

Favre-Bonte, S., Darfeuille-Michaud, A. and Forestier, C. (1995). Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. *Infect Immun* **63**, 1318-1328.

Gerlach, G.F., Allen, B.L. and Clegg, S. (1988). Molecular characterization of the type 3 (MR/K) fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **170**, 3547-3553.

Gioppo, N.M.R., Elias, W.P., Jr., Vidotto, M.C., Linhares, R.E., Saridakis, H.O., Gomes, T.A.T., Trabulsi, L.R. and Pelayo, J.S. (2000). Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterization of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. *FEMS Microbiol Lett* **190**, 293-298.

Gíron, J.A., Ho, A.S.Y. and Schoolnik, G.K. (1991). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**, 710-713

Jansen, A.M., Lockatell, V., Johson, D.E. and Mobley, H.L.T. (2004) .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* **72**, 7294-7305.

Johnson, J.R. and Stell, A.L. (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.

- Li, X., Johnson, D.E. and Mobley, H.L.T. (1999).** Requirement of MrpH for manose-resistant *Proteus*-like fimbriae-mediated hemagglutination by *Proteus mirabilis*. *Infect Immun* **67**, 2822-2833.
- Li, X., Rasko D.A., Lockett, C.V., Johnson, D.E. and Mobley, H.L.T. (2001).** Repression of bacterial motility by a novel fimbrial gene product. *EMBO J.* **20**, 4854-4862.
- Massad, G. and Mobley, H.L.T. (1994).** Genetic organization and complete sequence of the *Proteus mirabilis pmf* fimbrial operon. *Gene* **150**, 101-104
- Mobley, H.T.L. and Chippendale, G.R. (1990)** Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. *J. Infect. Dis.* **161**, 525-530.
- Mobley, H.L.T. and Warren, J.W. (1987).** Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. *J Clin Microbiol* **25**, 2216-2217.
- Moreira, C.G., Carneiro, S.M., Nataro, J.P., Trabulsi, L.R and Elias, W.P. (2003).** Role of type I fimbriae in aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **226**, 79-85.
- Nara, J.M., Rocha, L.B., Szulczewski, V., Troiano, P.E.R., Trabulsi, L.R., Piazza, R.M.F., and Cianciarullo, A.M (2005).** Bundle-forming pilus and intimin of enteropathogenic *Escherichia coli* as diagnosis markers. *Brazilian. Braz. J. morphol. Sci.* 207-208.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P. and Levine, M. M. (1987).** Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* **6**, 829-831.
- Nataro, J.P., Deng, Y., Maneval, D.R., German, A.L., Martin, W.C. and Levine, M.M. (1992).** Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect. Immun.* **60**, 2297-2304.

- Old, D. and Adegbola, R. (1982).** Hemagglutinins and fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. *J Med Microbiol* **15**, 551-564.
- Penfold, R.J and Pemberton, J.M. (1992).** An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria. *Gene* **118**, 145-146.
- Roberts, J.A., Fussel, E.N. and Kaack, M.B. (1990)** Bacterial adherence to urethral catheters. *J. Urol.* **144**, 264-269.
- Rózalski, A., Sidorczyk, Z., and Kotelko, K. (1997).** Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 65-89.
- Sabbuba, N., Hughes, G. and Stickler, D.J. (2002).** The migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over Foley catheters. *BJU Intern.* **89**, 55-60.
- Sambrook, E.F., Fritsch, T. and Maniatis, J. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sareneva, T., Holthöfer, H. and Korhonen, T.K. (1990).** Tissue-binding affinity of *Proteus mirabilis* fimbriae in the human urinary tract. *Infect Immun* **58**, 3330-3336.
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall'Agnol, M., Phillips, A.D. and Nataro, J.P. (2001)** Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **41**, 983-997.
- Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heesemann, J. and Karch, H. (1995).** Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **33**, 701-705.
- Toledo, M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. (1982a)** EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano-desaminase. *Rev. Microbiol.* **13**, 309-315.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F. and Trabulsi, L.R. (1982b) MILi: um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. *Rev. Microbiol.* **13**, 230-235.

Zhao, H., Li, X., Johnson, D.E., Bolnfield, I., and Mobley, H.L.T (1997). In vivo phase variation of MR/P fimbrial gene expression in *Proteus mirabilis* infecting the urinary tract. *Mol. Microbiol.* **48**, 1009-1019.

Zunino, P., Geymonat, L., Allen, A.G., Legnani-Fajardo, C. and Maskell, D.J. (2000). Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **29**, 137-144

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Dr. H.L.T. Mobley, University of Maryland School of Medicine, for the gift of *P. mirabilis* HI4320 strain.

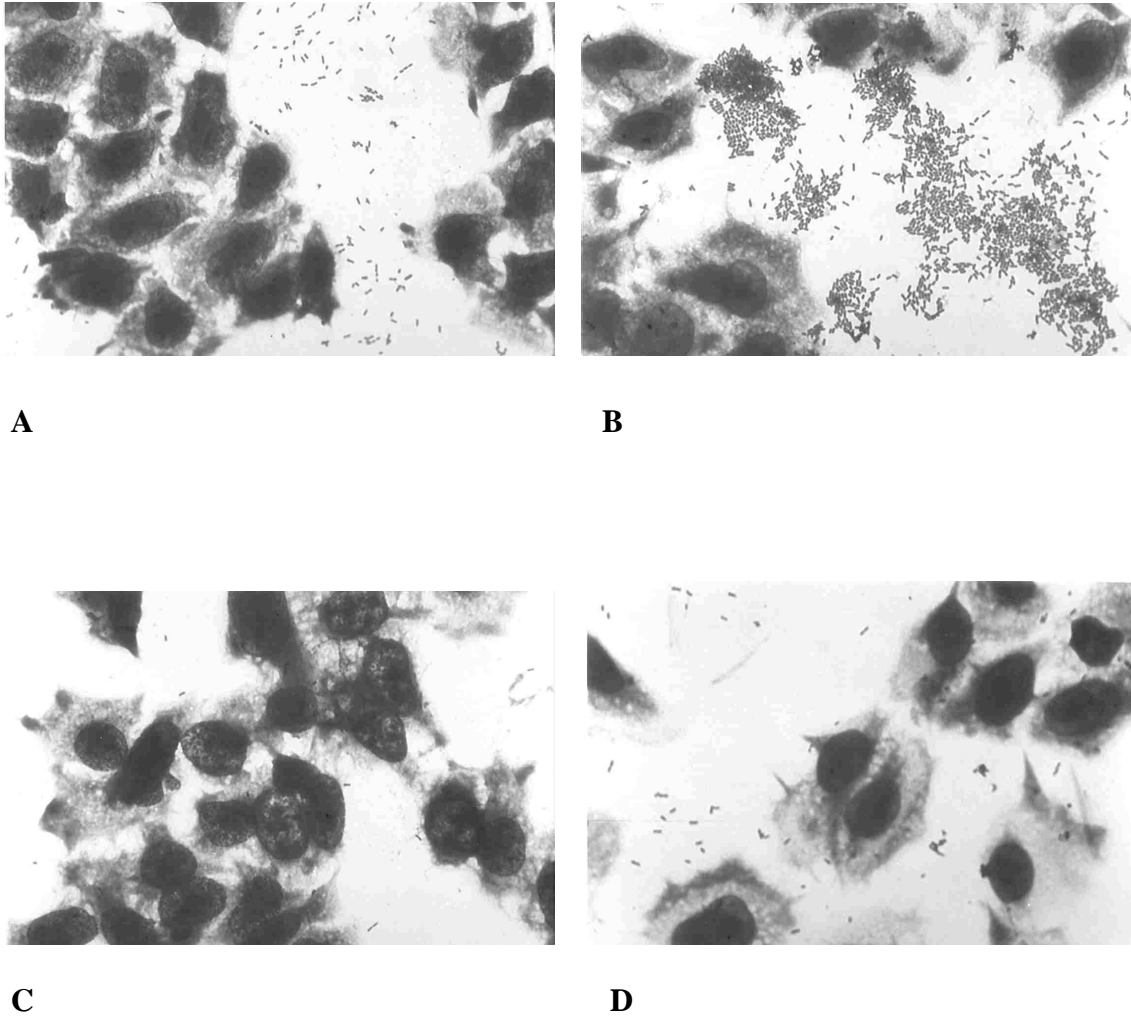


Figure 1. HEp-2 adherence assays with (A) *P. mirabilis* UEL-13, 3-h assay, (B) *P. mirabilis* UEL-13, 6-h assay, (C) *P. mirabilis* UEL-13::*mrpA*, 3-h assay, and (D) *P. mirabilis* UEL-13::*mrpA*, 6-h assay. Magnification: 1000X.

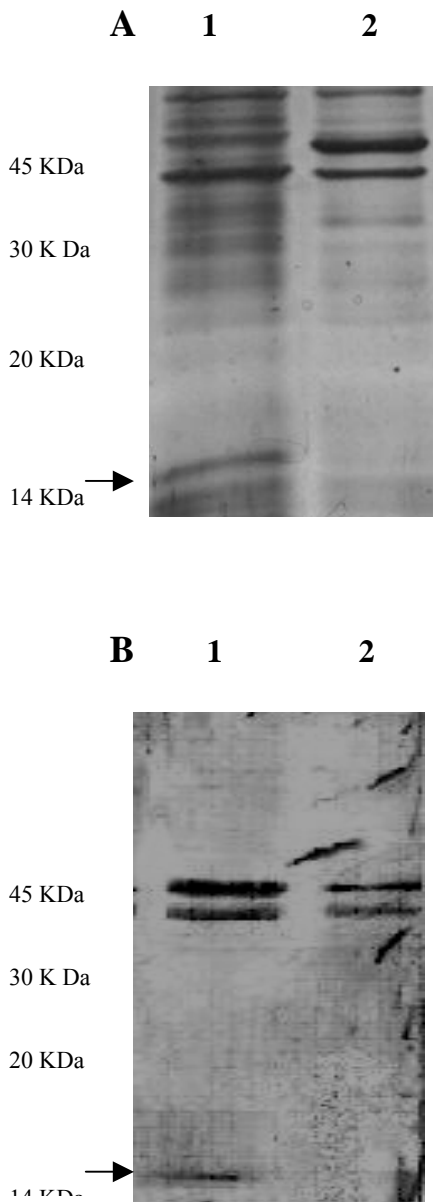
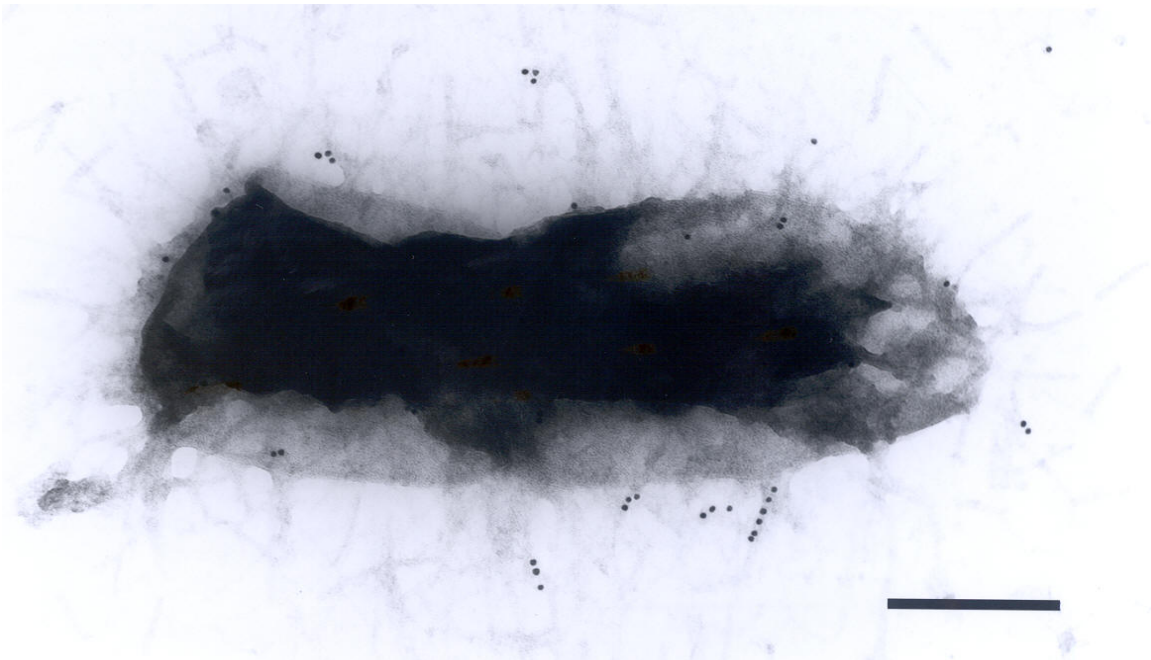


Figure 2. Detection of MR/P in fimbrial extracts. A: Silver stained SDS-PAGE (12%) of fimbrial extracts; B: Reactivity of the polyclonal antiserum against MR/P fimbriae with the proteins of fimbrial extracts detect by SDS-PAGE. Lane 1: Wild-type strain *P. mirabilis* UEL-13. Lane 2 : The MR/P fimbrial mutant *P. mirabilis* UEL-13::*mrpA*.

(\rightarrow) indicate position of MrpA.

A



B

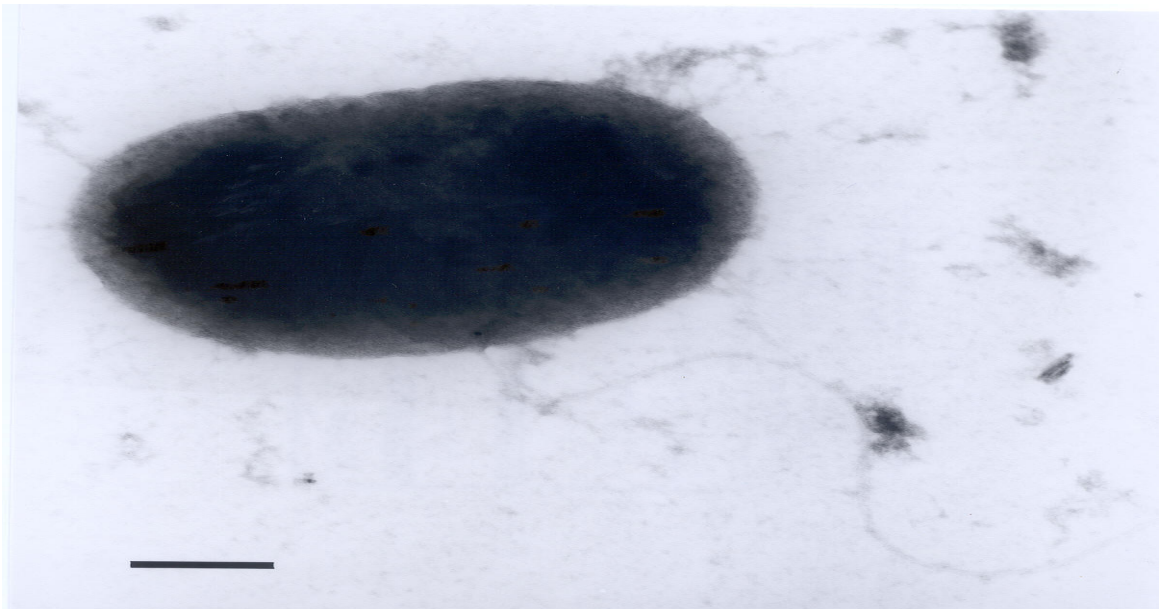


Figure 3. Transmission electron microscopy of immunogold staining for MR/P fimbriae. A: Strain *P. mirabilis* UEL-13 (magnification: 86000X, scale bar: 250 nm). B: Strain *P. mirabilis* UEL-13::*mrpA* (magnification: 93000X, scale bar: 200 nm).

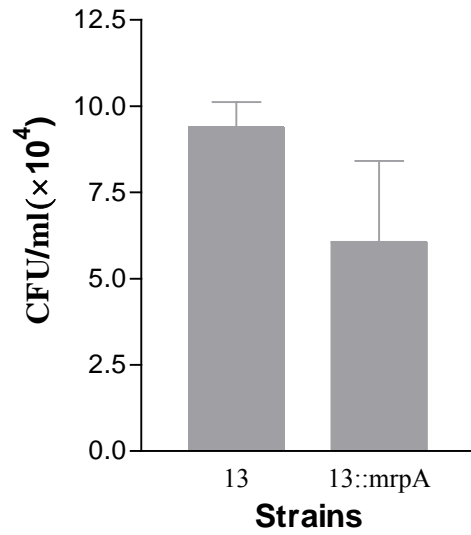


Figure 4. HEp-2 cell-adherent bacterial counts of *P. mirabilis* UEL-13 and UEL-13::*mrpA*. (One sample t test; P value (two tailed)= UEL-13 (0,0020) and UEL-13::*mrpA* (0,0464); values significant for $\alpha=0,05$)

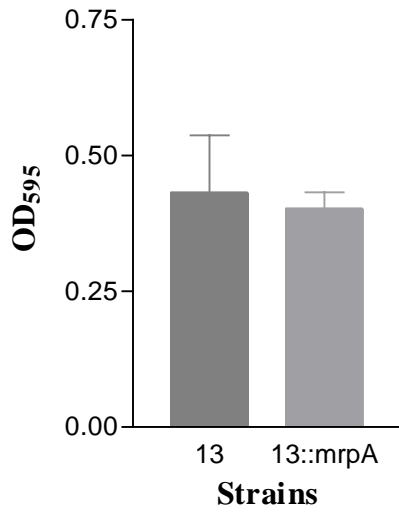


Figure 5. Biofilm formation of *P. mirabilis* UEL-13 and UEL-13::*mrpA* on polystyrene plates. (One sample t test; P value (two tailed)= UEL-13 (0,0194) and UEL-13::*mrpA* (0,0018); values significant for alpha=0,05)

Table 1. Primer sequences, sizes of amplified DNA fragments and annealing temperature used in this study

Genetic Sequence	Primer sequence (5'-3')	Amplified Fragment (bp)	Annealing Temperature (°C)	Reference
<i>mrpA</i>	(F) GAGCCATTCAATTAGGAATAATCCA	648	58	This study
	(R) AGCTCTGTA CTTCTGTACAGA			
<i>mrpA-internal</i>	(F) ATGAGCTCTGCGGGTTCTGCTTT	419	67	This study
	(R) ATGGTACCTCAGATGCAGAACCT			
<i>mrpH</i>	(F) CCTTGTTATGGTTGGCCTGT	444	58	This study
	(R) AGCCAGATGCGATAACCAAC			
<i>fimH</i>	(F) TGCAGAACGGATAAGCCG GG	508	63	Johnson and Stell. (2000)
	(R) GCAGTCACCTGCCCTCCGTGA			
EAEC probe	(F) CTGGCGAAAGACTGTATCAT	630	53	Schmidt <i>et al.</i> (1995)
	(R) CAATGTATAGAAATCCGCTGTT			

<i>aggA</i>	(F) GCGTTAGAAAGACCTCCAATA	432	55	Gioppo <i>et al.</i>
	(R) GCCGGATCCTTAAAAATTAATTCCGGC			(2000)
<i>aafA</i>	(F) ACATGCATGCAAAAAATCAGAATGTTTGTT	550	59	Gioppo <i>et al.</i>
	(R) CGGGATCCATTTGTCACAAGCTCAGC			(2000)
<i>agg3C</i>	(F) GTTTGGAACCGGGAATTAACATTG	485	59	Bernier <i>et al.</i>
	(R) AACTTTAGATACCCCTCACGCAG			(2002)

F, Forward; R,Reverse

5 CONCLUSÕES

1. Todas as 35 amostras de *P. mirabilis* uropatogênicas apresentaram um padrão de adesão agregativa em células HEp-2 após 6 horas de incubação, com predominância de bactérias aderidas na lamínula.
2. No teste de biofilme (poliestireno), 42,8% das amostras apresentaram forte adesão ao plástico, 28,6% adesão moderada e 28,6% adesão fraca.
3. Nenhum dos genes associados a adesão agregativa em EAEC e fímbria tipo I foi detectado nas 35 amostras, através da PCR.
4. A presença dos genes *mrpA* e *mrpH* foi detectada em todas as 35 amostras, através da PCR
5. A expressão da fímbria MR/P foi detectada por hemaglutinação de eritrócitos de galináceo, na presença e ausência de ácido tânico, em todas as 35 amostras. Já a expressão da fímbria tipo 1 não foi detectada em nenhuma das amostras
6. O mutante gerado, *P. mirabilis* UEL-13::*mrpA*, foi incapaz de hemaglutinar eritrócitos de frango, na presença e ausência de ácido tânico.
7. O modelo de adesão agregativa apresentado pela amostra selvagem *P. mirabilis* UEL-13, não foi detectado pela amostra mutante *P. mirabilis* UEL-13::*mrpA* em 6 horas.
8. O mutante *P. mirabilis* UEL-13::*mrpA* apresentou redução significativa na formação do biofilme em relação ao selvagem.
9. O padrão de adesão agregativa e o biofilme em *P. mirabilis*, estudado neste trabalho, são eventos multifatoriais, sendo a fímbria MR/P um destes fatores.
10. *P. mirabilis* possui vários fatores de virulência que podem contribuir para a patogênese da ITU, especialmente, o modelo de adesão agregativa em células epiteliais e a capacidade de aderir em superfícies inertes.